

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
WAFAA YAHYAOUÏ

MESURES SIMULTANÉES
DE L'ÉMISSION DE FLUORESCENCE
ET DE LA DÉSACTIVATION THERMIQUE
DANS LES MEMBRANES PHOTOSYNTHÉTIQUES

Avril 1995

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

La dissipation de l'énergie lumineuse absorbée par les pigments photosynthétiques chlorophylliens s'effectue par trois voies principales: la dissipation thermique, l'émission de fluorescence et le travail photochimique. *In vivo*, les réactions photochimiques, qui sont initiées par des séparations des charges suivies du transfert d'électrons, engage plus de 90% de la totalité de l'énergie absorbée. En altérant ces réactions photochimiques par des inhibiteurs sélectifs ou par saturation à la lumière, on arrive à augmenter la portion des deux autres moyens de désactivation, notamment la fluorescence et l'émission thermique. Ainsi, l'analyse de la fluorescence et de la dissipation thermique, dans les conditions où les réactions photosynthétiques sont inhibées, a représenté depuis longtemps un moyen efficace pour étudier différents aspects physiologiques et moléculaires de la membrane photosynthétique.

Toutefois, alors que la spectroscopie de fluorescence a été pratiquement utilisée dans tous les domaines comme étant la seule sonde permettant l'étude de la photosynthèse, la spectroscopie photoacoustique n'a été utilisée avec succès que pour l'étude de l'emmagasinage de l'énergie photosynthétique.

Avec l'utilisation d'un appareil qui combine un spectromètre photoacoustique et un fluorimètre, nous étions en mesure de mener une série d'expériences visant principalement l'étude des variations simultanées que subissent les émissions thermique et de fluorescence lors de la saturation de l'activité photosynthétique dans les membranes. Ainsi, grâce à la comparaison entre ces mesures prises simultanément, nous avons pu répondre à diverses questions accumulées depuis des années et qui se retrouvent pratiquement dans tous les travaux effectués dans le domaine de la photosynthèse.

Notre étude a porté sur deux volets principaux, le premier consiste en l'étude du quenching non photochimique de la fluorescence et de la désactivation thermique. Le concept du quenching non photochimique est tout à fait nouveau et original en ce qui concerne l'émission thermique. Une nouvelle terminologie et une nouvelle équation ont été introduites dans cette étude permettant d'identifier et de quantifier le "quenching non-photochimique de l'émission thermique". Ce nouveau paramètre ainsi créé, nous a permis d'effectuer une étude sérieuse qui a traité de tous les aspects de la régulation thermique lors de la désactivation de la chlorophylle excitée. L'effet des découpleurs et de différents inhibiteurs a été examiné afin de confirmer la validité de notre paramètre, ainsi que de décrire les relations étroites qui existent entre l'émission de fluorescence et thermique d'une part, et d'étudier, d'autre part, l'effet de la variation du gradient électrochimique transmembranaire des protons et l'effet de la variation du pH luminal sur ces deux quenchant. L'effet du cycle des xanthophylles a été aussi étudié sur ces membranes, et le résultat le plus fascinant que l'on a pu trouver, est que contrairement à tout ce qui se trouve depuis des années dans la littérature, l'activation de ce cycle n'a aucun effet sur le quenching thermique.

Ces résultats nous ont permis de décrire de façon plus adéquate le rôle du quenching non-photochimique dans la régulation et la dissipation de l'excès d'énergie absorbée par les systèmes membranaires. Ainsi, on peut dire que le quenching non-photochimique est exclusivement contrôlé par la variation du pH luminal, et que le cycle des xanthophylles entre en action quand ce dernier devient très faible. Ces changements physiologiques provoquent des réarrangements structuraux dans les CCLII, résultant en l'augmentation du quenching non-photochimique de fluorescence et nécessitant une grande portion de l'émission thermique qui se retrouve engagée dans ces processus et qui n'est donc pas dégagée. Ce résultat explique le sens exact de la participation du cycle des xanthophylles dans la protection de la membrane contre l'excès de lumière, déterminant définitivement le sort et le rôle de l'emmagasiner de l'énergie photosynthétique et de la dissipation thermique dans les systèmes membranaires photosynthétiques.

Finalement, pour s'assurer que les phénomènes que l'on a étudiés sont strictement dus au quenching énergie-dépendant produit par l'augmentation du pH luminal, nous avons aussi vérifié l'effet de la photoinhibition à court terme sur les mêmes membranes par l'utilisation d'un agent ADRY qui conduit à la formation d'un quenching non photochimique de photoinhibition. Les quenchant obtenus pour l'émission de fluorescence ou l'émission thermique présentaient la particularité d'être plus grands que les quenchant énergie-dépendants notés dans le cas des découpleurs et des inhibiteurs. En outre, la différence que présentait le FCCP par rapport à l'ascorbate est que le quenching non photochimique qu'il provoque est accompagné par d'une émission thermique d'un pourcentage très élevé.

Le deuxième volet de notre étude a été consacré à l'étude de l'origine du signal photoacoustique grâce à la détermination d'un paramètre capable d'analyser le quenching photochimique de l'émission thermique. Le résultat que l'on a obtenu montre que, contrairement à l'émission de fluorescence, le signal photoacoustique est contrôlée non seulement par le transport linéaire des électrons, mais aussi par un transport cyclique autour des PSII. Ces travaux ont conduit à l'attribution d'un rôle de protection de la membrane contre la photoinhibition pour le PSII cyclique.

En termes généraux, l'introduction de la notion du quenching thermique, montre qu'il existe une grande différence entre la régulation de l'émission thermique et celle de la fluorescence au sein d'un même état énergétique de la membrane. En outre, ce nouveau concept ouvre des horizons nouveaux et très prometteurs pour l'utilisation de la spectroscopie photoacoustique dans l'étude de la régulation et la dissipation de l'énergie d'excitation, ainsi que pour déterminer différents aspects structuraux et fonctionnels de la membrane photosynthétique.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
LISTE DES FIGURE.....	xiv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
 CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	 1
1. 1. LA PHASE LUMINEUSE DE LA PHOTOSYNTHÈSE.....	3
1. 1. 1. Schéma général de la photosynthèse.....	3
1. 1. 2. Le photosystème II.....	5
1. 1. 2. 1. Structure et organisation du PSII.....	7
1. 1. 2. 2. L'activité de l'eau-plastoquinone oxydoréductase ..	8

1. 1. 3. Le transport d'électrons	10
1. 1. 3. 1. Le centre réactionnel du PSII et la réduction de Q_B	10
1. 1. 3. 2. La plastoquinone: connexion entre PSII et Cyt b_6f	10
1. 1. 3. 3. Le complexe du cytochrome b_6f	10
1. 1. 3. 4. La plastocyanine: connexion entre Cyt. b_6f et PSI	12
1. 1. 3. 5. Le centre réactionnel du PSI	12
1. 1. 4. L'ATP synthase et le couplage énergétique	13
1. 1. 5. La photoinhibition	15
1. 2. SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE	18
1. 2. 1. Méthode photoacoustique	18
1. 2. 2. Application de la SPA à la photosynthèse	20
1. 3. SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE	24
1. 3. 1. Les bases biophysiques de l'émission de fluorescence	24
1. 3. 1. 1. Origine de l'émission de fluorescence	25
1. 3. 1. 2. Induction de fluorescence.	26
1. 3. 2. Le "quenching" de fluorescence	27
1.3. 2. 1. Mécanisme du quenching énergie-dépendant	28
1. 3. 2. 2. Les aspects physiologiques de q_E	30

1. 4. PROJET ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	32
1. 4. 1. Régulation non-photochimique de l'émission thermique . . .	33
1. 4. 2. Régulation photochimique de l'émission thermique	34
CHAPITRE II : MATERIEL ET MÉTHODES	35
2. 1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS.	35
2. 1. 1. Préparation des thylacoïdes	35
2. 1. 2. Préparation des PSII	36
2. 1. 3. Extraction des protéines extrinsèques	36
2. 2. TRAITEMENTS DES ÉCHANTILLONS.	37
2. 2. 1. Addition des découpleurs et inhibiteurs	37
2. 2. 2. Photoinhibition	37
2. 3. MÉTHODOLOGIE	39
2. 3. 1. Mesure de dégagement d'oxygène	39
2. 3. 2. Mesure photoacoustique et de fluorescence	39
2. 3. 2. 1. Description de l'appareil	39
2. 3. 2. 2. Prise de mesure	43

CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	46
3.1. DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES DU "QUENCHING"	46
3.1.1. Les signaux photoacoustique et de fluorescence	46
3.1.2. Calcul des paramètres du "quenching"	49
3.2. RÉGULATION NON-PHOTOCHIMIQUE DE L'ÉMISSION	
THERMIQUE	57
3.2.1. Variation non photochimique de l'émission thermique	58
3.2.2. Analyse du quenching non photochimique thermique	61
3.2.3. Régulation du quenching non-photochimique thermique	68
3.2.3.1 Effet de Nigéricine/Valinomycine et de la Tentoxine	68
3.2.3.2. Effet de la procaine	75
3.2.3.3. Effet du DCCD	79
3.2.3.4. Effet de l'ascorbate	83
3.2.3.5. Effet du FCCP	97
3.2.4. Conclusion	104

3. 3. RÉGULATION PHOTOCHEMIE DE	
L'ÉMISSION THERMIQUE	106
3. 3. 1. Effet de la photoinhibition sur les membranes	
thylacoïdiennes	107
3. 3. 2. Effet de la photoinhibition sur les PSII	114
3. 3. 3. Effet de la photoinhibition sur les PSII	
dépourvus de complexes de dégagement d'oxygène	118
3. 3. 4. Conclusion	120
CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.	121
RÉFÉRENCES	125

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADRY	: Accélération de la désactivation des intermédiaires de la réaction du clivage de l'eau
ATP	: Adénosine tri-phosphate
Chl	: Chlorophylle
CCL	: Complexe collecteur de lumière
CP	: Complexe protéique
Cyt	: Cytochrome
DCBQ	: 2, 5-dichloro-p-benzoquinone
DCCD	: Dicyclohexylcarbodiimide
DCMU	: 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthyl urée
EEP	: Emmagasiner de l'énergie photosynthétique
Em	: Potentiel énergétique de membrane
FAD	: Flavine adénine dinucléotide
FCCP	: Carbonyl cyanide p-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone
FNR	: Ferrédoxine-NAD ⁺ réductase
His	: Histidine

Mes	: Acide 4-(morpholino)ethane sulfonique
NADP⁺	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydée
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
PA	: Photoacoustique
PAM	: Pulse amplitude modulated
PC	: Plastocyanine
PFD	: Densité du flux photonique
Phéo	: Péophytine
PQ	: Plastoquinone
PQH₂	: Plastoquinol
PSI	: Photosystème I
PSII	: Photosystème II
QA	: Quinone A premier accepteur d'électron
QB	: Quinone B second accepteur d'électron
q_E	: Quenching énergie-dépendant
q_I	: Quenching de photoinhibition
q_N	: Quenching non-photochimique
q_P	: Quenching photochimique
q_T	: Quenching de transition de phase des CCLII
SPA	: Spectroscopie photoacoustique
t_{1/2}	: Temps de demi-vie

Tes : Acide N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonique

Tyr : Tyrosine

Δ pH : Gradient électrochimique des protons

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les états énergétiques de la chlorophylle	2
Figure 2 : Schéma en Z de la photosynthèse	4
Figure 3 : Modèle schématique du photosystème II	6
Figure 4 : Les états rédox du dégagement d'oxygène et des ions Mn.	9
Figure 5 : Organisation des complexes membranaires de la photosynthèse .	11
Figure 6 : La photoinhibition du transport d'électrons.	16
Figure 7 : Schéma représentatif de l'appareil de mesure.	41
Figure 8 : Schéma représentatif des signaux simultanés des émissions de . . fluorescence et photoacoustique.	47
Figure 9 : Tracé d'émission de fluorescence pris après 25 pulses	51
Figure 10 : Courbes représentatives des quenchings photochimiques de . . . fluorescence en fonction du nombre de pulses et courbe de corrélacion entre F et F'	53
Figure 11 : Courbes représentatives des quenchings non-photochimiques. . de fluorescence en fonction du nombre de pulses et courbe de corrélacion entre F et F'.	55
Figure 12 : Tracés des émissions simultanées de fluorescence et photoacoustique	59
Figure 13 : Quenchings non-photochimiques des émissions thermiques et de fluorescence.	62

Figure 14 : Corrélation entre les quenchings non-photochimiques de fluorescence en considérant ou non F_0	66
Figure 15 : Tracés d'émission de la fluorescence et photoacoustique en absence et en présence de nigéricine/valinomycine ou de tentoxine	70
Figure 16 : Effet de nigéricine/valinomycine et de tentoxine sur les quenchings non photochimiques thermique et de fluorescence	72
Figure 17 : Corrélation entre les quenching non-photochimiques de Fluorescence et thermique pour l'échantillon contrôle et en présence de nigéricine/valinomycine ou de tentoxine	74
Figure 18 : Effet de la procaine sur les quenchings non-photochimiques des émissions thermique et de fluorescence	77
Figure 19 : Corrélation entre les quenching non-photochimiques de fluorescence et thermique en présence de procaine	78
Figure 20 : Effet du DCCD sur les quenchings non-photochimiques thermique et de fluorescence	81
Figure 21 : Corrélation entre les quenchings non-photochimique thermique et de fluorescence en présence de DCCD	82
Figure 22 : Schéma représentatif du cycle des xanthophylles et de son mode probable d'action et de régulation au sein de la membrane photosynthétique	84
Figure 23 : Tracés d'émission de la fluorescence et photoacoustique en absence et en présence de 60 mM d'ascorbate	86
Figure 24 : Effet de l'ascorbate sur les quenchings non photochimiques. des émissions thermique et de fluorescence	88
Figure 25 : Effet de la concentration d'ascorbate sur les quenchings non photochimiques de fluorescence et thermique	89

Figure 26 : Effet de la concentration d'ascorbate sur les quenchings photochimiques de fluorescence et thermique.	94
Figure 27 : Schéma représentatif de l'emplacement et du rôle de l'ascorbate peroxydase dans la membrane photosynthétique	96
Figure 28 : Tracés de fluorescence et photoacoustiques en présence et en absence de FCCP.	98
Figure 29 : Effet du FCCP sur le quenching photochimique de émissions. thermique et de fluorescence	100
Figure 30 : Effet du FCCP sur les quenchings non photochimiques. thermique et de fluorescence	102
Figure 31 : Corrélation entre les quenchings non-photochimiques. thermique et de fluorescence et en présence de FCCP.	103
Figure 32 : Taux de dégagement d'oxygène chez les thylacoïdes en fonction du temps d'illumination	108
Figure 33 : Courbes représentatives des valeurs des quenchings photochimiques thermique et de fluorescence en fonction du temps d'illumination chez les thylacoïdes.	110
Figure 34 : Corrélation entre les quenchings simultanés de la désactivation thermique et de l'émission de fluorescence	111
Figure 35 : Taux de dégagement d'oxygène dans les membrane enrichies en PSII en fonction du temps d'illumination.	115
Figure 36 : Courbes représentatives des valeurs des quenchings photochimiques de fluorescence et thermique en fonction du temps d'illumination dans les particules des PSII.	116
Figure 37 : Corrélation entre les quenchings simultanés de la désactivation thermique et de l'émission de fluorescence	117

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulation des différents produits utilisés, de leurs concentrations, et leurs sites d'action respectifs	38
Tableau 2 : Quenchant thermique et de fluorescence par rapport à leurs émissions respectives et à l'énergie totale	63
Tableau 3 : Effet de nigéricine/valinomycine et de tentoxine sur les émissions de fluorescence et thermique	71

CHAPITRE I

INTRODUCTION

La croissance des plantes nécessite la conversion efficace de l'énergie solaire en intermédiaires chimiques stables utilisables par la suite dans les réactions métaboliques. L'absorption des radiations émises dans le spectre du visible dépend des états électroniques des pigments photosynthétiques antennaires. Chez les plantes supérieures, ces pigments sont divisés en trois classes principales: les chlorophylles, les phycobilines et les caroténoïdes. Toutefois, c'est la chlorophylle a qui joue le rôle clé dans la capture et la transduction de l'énergie lumineuse absorbée.

La chlorophylle a est formée d'un noyau porphyrique qui renferme neuf doubles liaisons conjuguées. Après absorption d'un photon, un des électrons du système conjugué change d'état excité et passe à un niveau énergétique plus élevé. Après un certain temps, il retourne à son état fondamental en dissipant l'énergie d'excitation selon un des processus de la désexcitation de la chlorophylle illustrés dans la figure 1.

La relaxation thermique (appelée aussi transition non-radiative) entre les niveaux vibrationnels S_2 et S_1 conduit à une perte de l'excitation sous forme de chaleur. A partir de S_1 , l'énergie d'excitation peut être émise sous forme de fluorescence, de chaleur, ou peut être transférée aux accepteurs chimiques des centres réactionnels des deux photosystèmes de la membrane thylacoïdienne. *In vivo*, ce dernier mécanisme représente le principal moyen de désactivation des pigments excités.

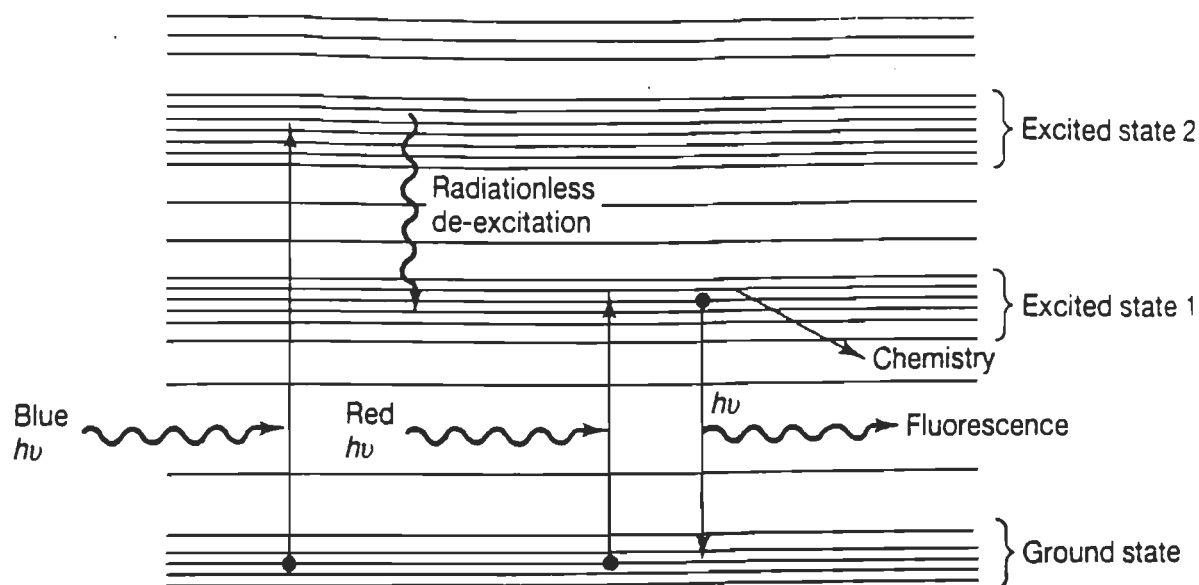


Figure 1 : Les états énergétiques de la chlorophylle. Modifié de D. Walker, 1979. Energy, Plants and Man, Packard Publishing, Chichester.

Ainsi, l'énergie totale absorbée par les systèmes antennaires peut être représentée par l'équation suivante:

$$E \text{ (totale)} = E \text{ (fluorescence)} + E \text{ (thermique)} + E \text{ (photochimie)}$$

Suite à l'altération ou la limitation des réactions photochimiques, la part d'énergie qui y aurait été engagée se trouve en excès dans les systèmes membranaires et emprunte les autres voies de dissipation, principalement la dissipation non radiative sous forme de chaleur. De nos jours, et avec l'amélioration des appareils et des techniques permettant une bonne séparation des composantes radiatives et non-radiatives de la désexcitation de la chlorophylle, une étude plus détaillée de la régulation de la désactivation thermique s'impose. Afin de réaliser cet objectif, en plus de la spectroscopie photoacoustique, une connaissance détaillée de la fluorescence et de la photosynthèse en phase lumineuse est absolument nécessaire.

1. 1. LA PHASE LUMINEUSE DE LA PHOTOSYNTHÈSE

1. 1. 1. Schéma général de la photosynthèse

La photosynthèse consiste en l'utilisation de l'énergie solaire par les plantes, les algues et certaines bactéries pour la synthèse de molécules organiques complexes. La portion de l'énergie lumineuse absorbée par les pigments photosynthétiques est éventuellement stockée par formation de liaisons chimiques. Cette conversion de l'énergie d'une forme à une autre est un processus complexe qui nécessite la coopération d'un grand nombre de molécules de pigments et d'un groupe de protéines dont l'ensemble statistique a été défini comme " Unité Photosynthétique ".

La plupart des protéines de la membrane du thylacoïde sont arrangées en quatre complexes supramoléculaires, le photosystème II (PSII), le cytochrome b_6f , le photosystème I (PSI), et l'ATP synthase (Anderson et Andersson, 1988). Ces complexes ont un arrangement asymétrique au sein de la bicouche lipidique de la membrane dans le but de fournir un transport vectoriel des électrons et une translocation de protons à travers la membrane. Le flux d'électrons à travers la membrane photosynthétique des organismes producteurs d'oxygène, et la translocation des protons à travers cette membrane qui l'accompagne, implique trois de ces complexes qui sont dans l'ordre du transport: (i) Le complexe du photosystème II (PSII) qui fournit les électrons au côté réducteur de la membrane. (ii) Le complexe du cytochrome b_6f qui occupe une position centrale dans la chaîne de transport des électrons des chloroplastes, des algues, et des cyanobactéries. (iii) Du côté oxydant, les électrons sont acheminés jusqu'au $NADP^+$ par le complexe du photosystème I (PSI). Le lien entre ces différents complexes se fait grâce à la mobilité latérale du pool de plastoquinones et à la plastocyanine.

D'un point de vue bioénergétique, les différents complexes protéines-pigments de la membrane photosynthétique sont généralement représentés par le schéma en Z de la photosynthèse (fig. 2). Cette représentation illustre les emplacements des différents complexes dans la membrane ainsi que les différents états redox et niveaux des énergies potentielles par lesquelles passent les électrons durant leur transport à travers la membrane.

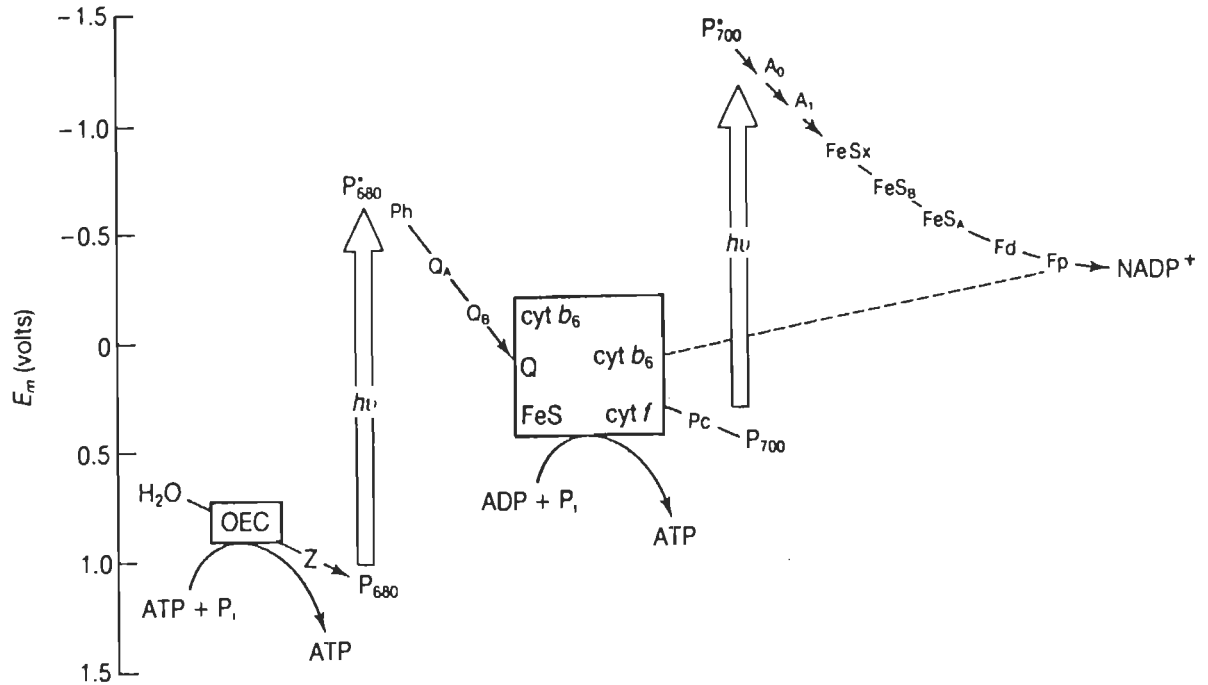


Figure 2: Le schéma en Z de la photosynthèse oxygénique. Les locations des deux sites de phosphorylation associés au transport des électrons sont désignés par les flèches courbées. Les transporteurs des électrons sont arrangés verticalement selon leur potentiel redox mesuré ou estimé (à pH 7.0). Aucune relation n'est apportée dans ce schéma entre les substrats ou les produits de synthèse d'ATP et les niveaux énergétiques. OEC, complexe de dégagement d'oxygène; Z, tyrosine qui joue le rôle du donneur au PSII; Q, plastoquinone; cyt, cytochrome; FeS, protéine à fer-sulfur de Ries; Pc, plastocyanine; P700, centre réactionnel du PSI; Fd, ferredoxine; Fp, flavoprotéine (ferredoxine-NADP reductase). La ligne en pontillets indique le flux cyclique des électrons à travers le PSI. Repris avec la permission du D. R. Ort et N. E. Good, 1988, *Trends Biochem. Sci.*, 13, 467-469.

L'absorption de l'énergie lumineuse se produit donc au niveau des antennes collectrices de lumière. Dans chaque photosystème, les antennes peuvent être considérées comme des étalages de chlorophylles canalisant l'énergie absorbée vers un centre photoactif unique, appelé centre réactionnel. C'est à son niveau que l'état électroniquement excité, généré par l'absorption de la lumière, est photochimiquement piégé. Les chlorophylles des centres réactionnels sont toujours trouvées en "paires spéciales ou dimères", une situation qui aide à la délocalisation de l'énergie. Ces dimères sont désignés par la lettre P, pour pigment, et par leur longueur d'onde maximale. Ainsi, chez les plantes supérieures, nous avons P680 et P700 comme chlorophylles du centre réactionnel dans le PSII et le PSI respectivement. Ces deux centres forment des "trappes" pour l'énergie lumineuse et sont arrangés en complexes moléculaires à proximité d'autres molécules, qui sont soit des accepteurs, soit des donneurs d'électrons. Toutefois, c'est au niveau du PSII que l'on étudie généralement les réactions photochimiques reliées à la régulation photosynthétique et au processus de désactivation par fluorescence.

1. 1. 2. Le photosystème II

Le complexe qui a retenu le plus d'attention depuis les années 80 est le complexe de l'oxydoréductase eau-plastoquinone, plus communément connu sous le nom du photosystème II. La compréhension moléculaire de ce photosystème représente le point de départ de la plupart des recherches en bioénergétique. De plus, il est le siège de plusieurs mécanismes d'adaptation et de protection de l'appareil photosynthétique.

Le photosystème II (PSII) est un complexe de pigments-protéines composé de plus de vingt protéines différentes, de chlorophylles (Chl), de phéophytines (Phéo), de caroténoïdes, de lipides, de quinones, et d'ions inorganiques (fig. 3). Il est localisé dans la région granaire de la membrane thylacoïdienne (Arntzen, 1978). A travers le complexe du PSII, l'énergie lumineuse est capturée par la chlorophylle du complexe collecteur de lumière, et est utilisée pour séparer les charges positives et négatives dans le centre réactionnel photochimique (P680 et Phéo). Les électrons sont transportés de la molécule d'eau vers la plastoquinone.

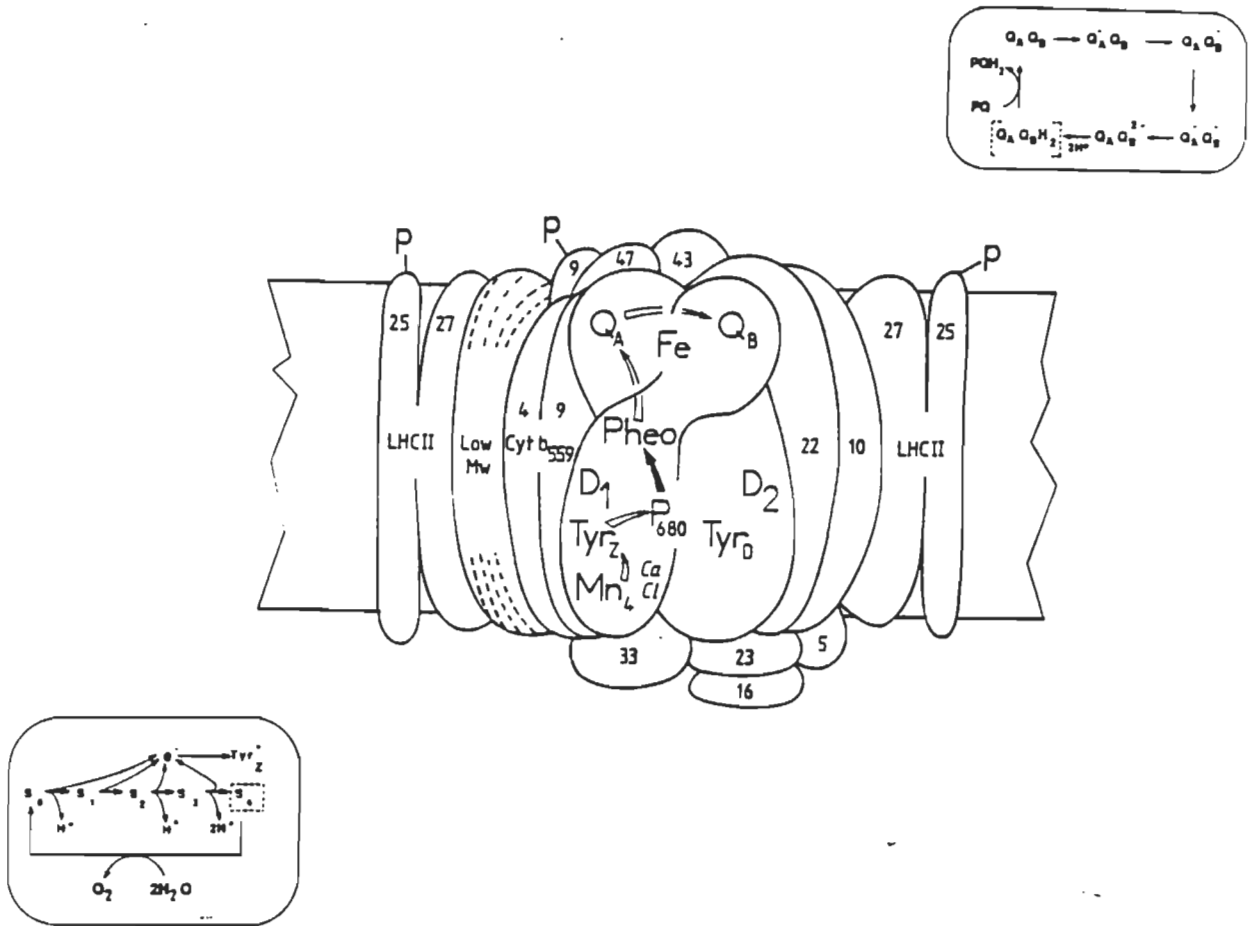


Figure 3 : Modèle schématique du photosystème II indiquant la séparation et la stabilisation des charges par le transport des électrons, ainsi que la donation des électrons aux côtés réducteur et oxydant. Andersson and Styring, Current Topics In Bioenergetics 1991, V16, Academic Press Publishing, San Diego.

1. 1. 2. 1. Structure et organisation du PSII

Un développement majeur dans la recherche en photosynthèse consiste en l'identification récente des protéines qui contiennent les éléments nécessaires pour les premières réactions photochimiques du PSII. Ces protéines comportent des résidus d'acides aminés spécifiques Tyr_Z et Tyr_D dont la fonction est le transfert d'électrons vers la chlorophylle du centre réactionnel, P680 à partir de l'oxydation de l'eau du côté donneur du PSII (Metz et al, 1989).

L'hétérodimère D1/D2 dans le PSII natif contient aussi deux quinones QA et QB qui stabilisent les charges du côté réducteur du PSII. Il abrite aussi un groupement de 4 Mn qui fonctionne dans le complexe d'oxydation de l'eau et qui a été récemment proposé être lié à la protéine D1 (Virgin et al, 1988).

Parmi les composantes du PSII, on trouve le cytochrome b-559. Ce complexe n'est pas impliqué dans le trajet principal des électrons dans le PSII. Toutefois, dans des conditions où le complexe d'oxydation de l'eau est inhibé, le Cyt b-559 peut être photo-oxydé par P680⁺ (Cramer et al, 1990). Il a été indiqué, en outre, que le Cyt b-559 peut être impliqué dans le transfert cyclique d'électrons autour du PSII (Mende et Wiessner 1983), ainsi que dans le transport membranaire des protons (Butler 1978).

Un autre complexe primordial dans la structure des PSII est le complexe de dégagement d'oxygène. Il est formé par trois protéines extrinsèques situées sur la surface thylacoïdienne interne, dont le poids moléculaire est de 33, 24 et 16 kDa respectivement (Andersson and Akerlund, 1987). La fixation de ces trois protéines sur la surface interne de la membrane s'effectue par des liens hydrogènes (Andersson and Styring, 1991). Plusieurs expériences ont montré que la protéine de 33 kDa est fortement connectée à l'hétérodimère D1/D2 (Gounaris et al, 1990) et lui permet de stabiliser le complexe de Mn impliqué dans la photolyse de l'eau (Mei et al, 1989). Elle a d'abord été considérée être la manganoprotéine catalytique du système d'oxydation de l'eau (Murata et al, 1983). Cependant, le rôle non-catalytique des protéines 33, 24 et 16 kDa a été observé et largement reconnu après avoir prouvé que l'activité du transport d'électrons, perdue par leur extraction, peut être restaurée par addition de Ca²⁺ et/ou de Cl⁻ (Ono et Inoué, 1984).

Finalement, toujours associées au PSII, on note la présence des antennes. 15 % de ces antennes sont intégrées au PSII par l'intermédiaire de CP 47 et CP 43 (Morrissey et al., 1989). La portion restante constitue deux complexes collecteurs de lumière, CCLII proximal et CCLII distal. La structure du CCLII a été récemment déterminée (Kuhlbrandt et Wang, 1991), et montre qu'il forme un trimère de structure triangulaire. Chaque sous-unité contient 15 molécules de chlorophylles (Butler et Kuhlbrandt, 1988) et quelques molécules de caroténoïdes (xanthophylles). Ces CCLII sont connectés avec le complexe du centre réactionnel via d'autres protéines chlorophylliennes, CP24, CP27 et CP29.

1. 1. 2. 2. L'activité de l'oxydoréductase eau-plastoquinone

Le PSII couple l'absorption de la lumière, qui conduit à la réaction primaire de séparation des charges, à la réduction de la plastoquinone et à l'oxydation de l'eau. Dans les plantes supérieures, la première réaction photochimique se produit au niveau du P680. Des travaux spectroscopiques récents utilisant les préparations du centre réactionnel du PSII, indiquent que le P680 est composé d'une paire spéciale de molécules de chlorophylle (Telfer et Barber, 1990) qui est cordonnée à deux histidines, His-197 et His-198 respectivement dans les protéines D2 et D1 (Nixon et al., 1992). La première réaction photochimique résulte en l'extraction d'un électron à partir de P680 qui est immédiatement transféré à la molécule de phéophytine (Klimov et al, 1977). Cette molécule est probablement attachée à la protéine D1 par liaison hydrogène (Nabedryk et al, 1990). Le potentiel rédox du couple Phéo/Phéo⁻ est approximativement -610 mV (Klimov et al, 1977).

Cette séparation primaire des charges est rapidement stabilisée par un transfert d'électrons de Phéo⁻ à la première quinone Q_A qui est réduite en semiquinone par un seul électron. De Q_A, l'électron est ensuite transféré à la seconde quinone Q_B. Le transfert de Q_A à Q_B se fait via un fer nonhémique contrôlé par une forte liaison du bicarbonate (Bryce et Hill, 1993). La forme semi-réduite de Q_B est fortement liée à D1 et ne peut être échangée avec le pool de plastoquinones. Suite à une seconde séparation de charges, Q_B⁻ est réduite sous forme de Q_B²⁻, elle est alors protonée en plastoquinol qui quitte le site de Q_B pour entrer en interaction avec le complexe du Cyt b₆f.

La forme $P680^+$ est très oxydante et potentiellement dangereuse pour les protéines qui l'entourent (Jegerschöld et al., 1990). Elle est aussi un très bon substrat pour les réactions de recombinaisons avec les électrons du côté accepteur qui pourraient conduire à la perte de l'état énergétique créé par la réaction de séparation des charges. Ces réactions indésirables sont minimisées par l'existence d'un moyen naturel de réduction, très efficace, et qui alimente rapidement $P680^+$ avec les électrons provenant du côté donneur du PSII.

Le mécanisme de l'oxydation de l'eau est basé sur la conformation tétranucléique des atomes de Mn qui subissent des réarrangements structuraux (Debus, 1992). Ce mécanisme implique différents états rédox appelés les états S (fig. 4). L'état le plus réduit, S_0 , est converti par oxydation en un état stable à l'obscurité. S_2 et S_3 sont formés par le transport net d'un, puis de deux électrons à travers le PSII. Après l'extraction d'un électron additionnel de S_3 , S_4 est formé, il est instable et donc c'est lui qui relâche l'oxygène. Le système retourne instantanément à l'état S_0 (Debus, 1992). Ce mécanisme semble impliquer l'oxydation des formes protonées de l'eau comme OH^- ou H_2O_2 , ce qui fait que l'oxydation de l'eau est accompagnée par un largage de protons (Vermaas et al., 1993).

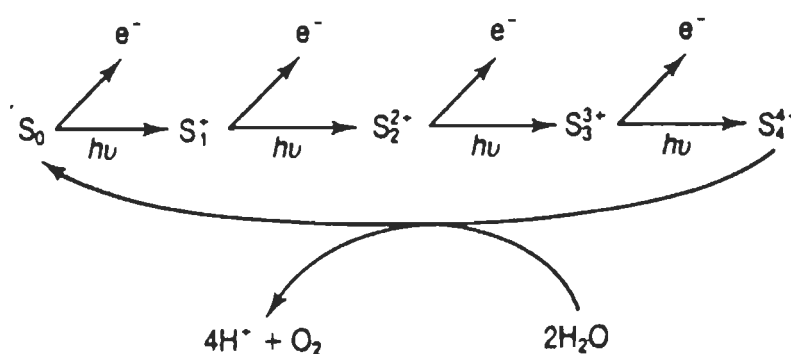


Figure 4 : Les états rédox du dégagement d'oxygène et des ions Mn. Energy, Plants and Man, Packard Publishing, Chichster.

1. 1. 3. Le transport d'électrons

Le flux d'électrons à travers la membrane photosynthétique est initié par la séparation des charges au niveau du photosystème II (PSII) qui fournit les électrons au côté réducteur de la membrane. Ces électrons sont par la suite transférés via le pool de plastoquinones au cytochrome b_6f qui occupe une position centrale dans la chaîne de transport des électrons. Du cytochrome b_6f , les électrons sont transportés par la plastocyanine au photosystème I (PSI) qui assure leur acheminement du côté oxydant jusqu'au $NADP^+$ (fig 5).

1. 1. 3. 1. Le centre réactionnel du PSII et la réduction de QB

L'énergie absorbée par les chlorophylles du CCLII est transférée au centre réactionnel, qui joue le rôle du donneur primaire du PSII. Le P680 transfère un électron à la phéophytine, puis à la quinone Q_A . Le temps de demi-vie caractéristique du transfert de l'électron entre $Phéo^-$ et le site de fixation de Q_A est 300-500 psec (Schatz et al., 1987). L'électron est transmis par la suite à la quinone Q_B dont la réduction totale se fait en deux étapes; la formation en premier lieu d'une semiquinone Q_B^- en 330 msec, ensuite d'une quinone réduite QBH_2 , en 280 msec (Eaton-Rye, 1988).

1. 1. 3. 2. La plastoquinone: connexion entre PSII et Cyt b_6f

La connexion entre le PSII et le Cyt b_6f se fait grâce à la plastoquinone qui couple le transport des électrons à une translocation de protons à travers la membrane. La grande taille du bassin de plastoquinones (40 molécules par P700), ainsi que la protonation et la déprotonation qui sont associées à ses états rédox, ont été à l'origine de cette constatation (Daldal, 1989).

1. 1. 3. 3. Le complexe du cytochrome b_6f

La composition polypeptidique du complexe du cytochrome b_6f est très simple. Il contient quatre polypeptides dont la présence est bien établie par les biochimistes (Hauska et al., 1983) : le Cyt f , le Cyt b , la protéine à $[2Fe-2S]$ dite de Rieske et la "sous-unité IV". D'autres composantes purifiées avec le complexe du Cyt b_6f peuvent ne pas être propres à ce complexe, mais elles lui sont adsorbées, telle la ferrédoxine- $NADP^+$ réductase (FNR) (Clark et Hind, 1983).

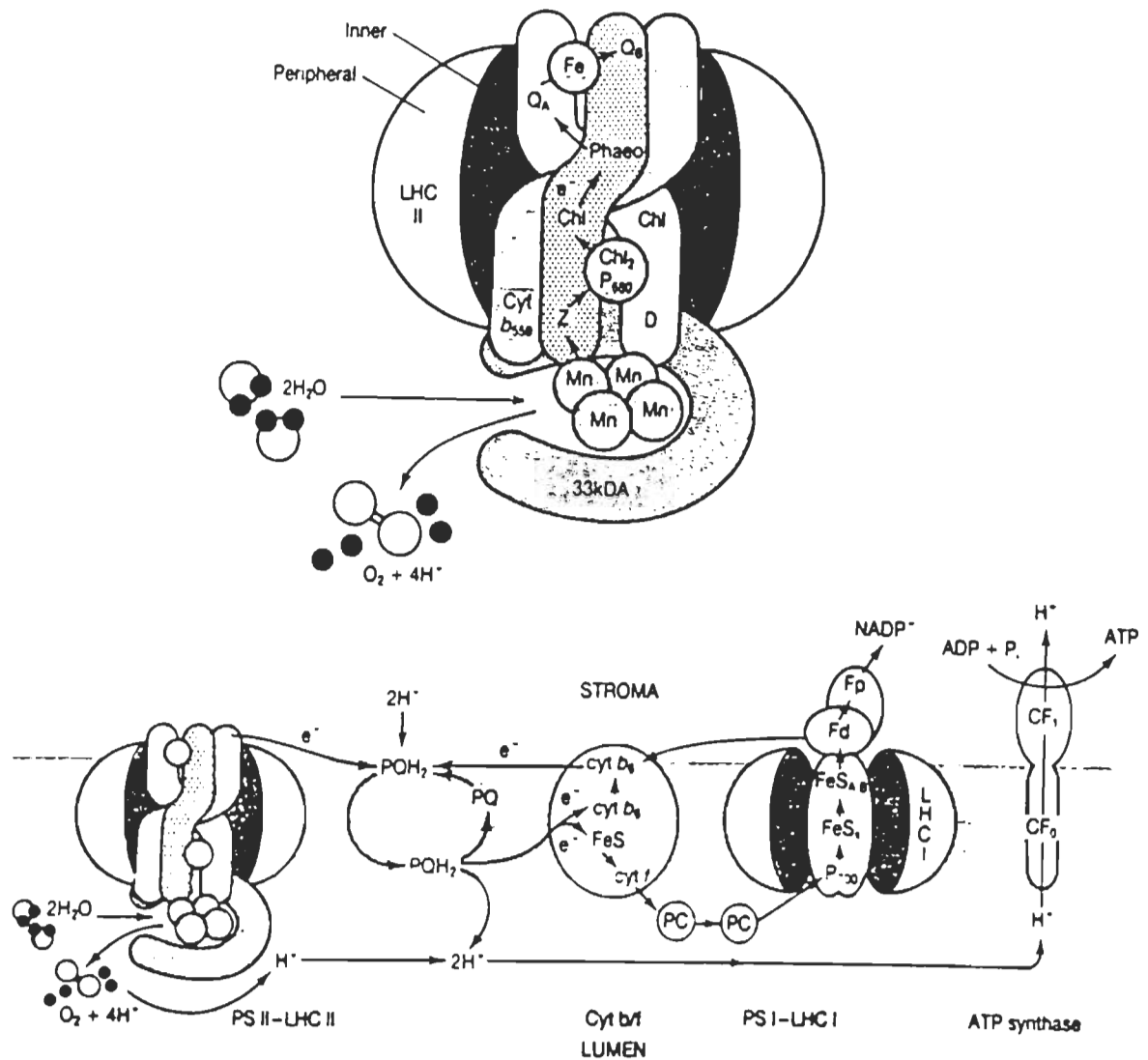


Figure 5 : Organisation des complexes membranaires participant dans la collection de la lumière, le transfert des électrons de l'eau au $NADP^+$, et la translocation des protons à travers la membrane, et leur retour au stroma par l'ATP synthase. Bryce and Hill, Plant Biochemistry and Molecular Biology. Ed. by Lea and Leegood, 1993, Wiley Publishers, Chichester.

Du point de vue fonctionnel, l'oxydation du plastoquinol (PQH₂) se produit à travers le Cyt b₆f dont le site de liaison forme une niche où vient se loger le quinol (Daldal et al., 1989). Cette oxydation se fait par la réduction séquentielle des donneurs à haut potentiel ($0.29 \leq E_m \leq 0.37$) du centre réactionnel du PSI, de la protéine Fer-Sulfure de Rieske, du Cyt f et de la plastocyanine.

1. 1. 3. 4. La plastocyanine: connexion entre Cyt b₆f et PSI

La plastocyanine (PC) est le second transporteur d'électrons dans la membrane du thylacoïde. Les demi-vies associées avec sa diffusion sont 100-300 µsec pour la réduction de PC par le Cyt f, et respectivement 10-20 et 100-200 µsec pour l'oxydation de PC fixée et mobile par le centre réactionnel du PSI, (Bottin et Mathis, 1987). Le site de liaison de la plastocyanine dans le PSI est le produit de son gène *psaF* (Hippler et al., 1989), auquel la PC se lie probablement près de son groupement redox à cuivre. Elle est alors oxydée et remplacée par une seconde molécule de plastocyanine réduite, dans un délai de 110 µsec (Bottin et Mathis, 1987).

1. 1. 3. 5. Le centre réactionnel du PSI

Le système d'accepteurs d'électrons du PSI, avec cinq groupes prosthétiques différents, est le plus compliqué de tous les centres réactionnels photosynthétiques. Dans l'ordre croissant des E_m et l'échange favorable de l'énergie libre du transport d'électrons, ces accepteurs sont A₀, A₁, [4Fe-4S]_x, et [4Fe-4S]_B-[4Fe-4S]_A. Le temps caractéristique pour les événements du transfert d'électrons primaire est 15 psec pour $P700 + A_0 \text{ (Chl } a) \rightarrow P700^+ + A_0^-$ (Wasielewski et al., 1987), environ 40 psec pour $A_0^- + A \rightarrow A_0 + A_1^-$ (Shuvalov et al., 1986), et 15 nsec (Mathis et Setif, 1988) ou 200 nsec (Brettel, 1988) pour l'oxydation de A₁⁻, probablement par le centre [4Fe-4S]_x. Des centres [4Fe-4S]_A et [4Fe-4S]_B, le transport des électrons à NADP⁺ est assuré par une protéine nonhémique [2Fe-2S], la ferrédoxine, la flavoprotéine-FAD et la FNR.

1. 1. 4. L'ATP synthase et le couplage énergétique

Il est tout à fait impossible de parler de la photosynthèse en phase lumineuse sans évoquer le rôle de l'ATP synthase et du couplage énergétique dans la membrane du thylacoïde. L'ATP synthase, ou CF₀F₁, est localisé dans les lamelles stromatiques et les régions exposées des empilements granaux. Il est formé de deux parties distinctes morphologiquement et fonctionnellement. Une partie hydrophile, F₁, qui émerge de la membrane et contient les sites catalytiques responsables de la synthèse et/ou l'hydrolyse d'ATP. Une autre partie, hydrophobe, F₀, et qui est insérée dans la bicouche lipidique. Elle agit comme un canal de protons, permettant le rétablissement du gradient électrochimique photo-induit.

Le transport des électrons, induit par la lumière, à travers le PSII, le Cyt b₆f, et le PSI, est couplée à un pompage des protons à travers la membrane, du côté stromal au côté luminal. Le flux de retour de ces protons au stroma, à travers CF₀F₁, conduit à la synthèse d'ATP qui est relâchée dans le stroma, et utilisée pour la suite des réactions photosynthétiques dans le noir (Glaser et Norling, 1991). Les interactions membrane-protons, qui se produisent entre les sites de relâchement des H⁺ lors des réactions rédox, et le complexe du canal à H⁺, CF₀, déterminent ce qu'on appelle le couplage énergétique dans les chloroplastes.

Le flux des protons ainsi créé peut être soit localisé dans la membrane, il est donc séparé de la phase lumineuse par une barrière de protéines extrinsèques, soit transmembranaire, il est dit alors délocalisé, et les protons de la membrane sont en équilibre avec ceux du lumen (Dilley, 1991). On ne sait pas encore quelles sont les structures physiques qui constituent les domaines localisés liés aux protons, mais il paraît que les parties des protéines intrinsèques exposées au lumen, et certaines protéines extrinsèques du côté luminal, tel le complexe de dégagement d'oxygène, peuvent créer un espace entre les têtes polaires de la couche lipidique, et la masse de protéines alignées sur la face lumineuse.

Les protons acheminés dans ce canal interne, peuvent s'équilibrer à tout moment avec les protons de la phase aqueuse. Les conditions qui déplacent le mode du couplage du localisé au délocalisé (et *vice versa*) sont contrôlées par les concentrations ioniques des phases aqueuses. L'hypothèse avancée pour ce déplacement est que Ca^{2+} peut se fixer sur un site spécifique de la barrière du canal du flux des protons du côté luminal de la membrane du thylacoïde, et le gradient du couplage énergétique est maintenu dans le mode localisé. Le déplacement de la liaison Ca^{2+} provoque l'ouverture de la barrière et le déversement des protons dans le lumen, conduisant au mode de couplage énergétique délocalisé . Les chloroplastes tendent à adopter le mode localisé du couplage probablement à cause de leur haute concentration en Ca^{2+} .

Le mode de couplage localisé peut avoir plusieurs avantages physiologiques: 1)- la formation rapide du gradient électrochimique de protons (Beard et al., 1988), 2)- l'osmorégulation du volume du thylacoïde, 3)- la régulation de l'acidification du lumen (Kreimer et al., 1988), 4)- l'équilibration des protons avec ceux du lumen, dans les conditions limitant la formation d'ATP; la protonation des groupes carboxyles de la barrière provoque le déplacement du Ca^{2+} et l'ouverture du canal (Dilley, 1991), et 5)- le contrôle de la déépoxydation des violaxanthines (Dilley, 1991). Le pH du lumen peut avoir un effet très prononcé sur l'enzyme violaxanthine déépoxydase, connu pour être actif au pH 5.2 (Hager, 1994), et qui permet la conversion des violoxanthines, dont la concentration est influencée par le mode de couplage, soit localisé (violoxanthines moins disponibles), soit délocalisé (violoxanthines plus disponibles), en zéaxanthines. Cette conversion est d'une grande importance physiologique si on considère le rôle capital, récemment suggéré, que jouent les zéaxanthines dans les processus de la dissipation non-radiative de l'excès de l'énergie lumineuse absorbée par les plantes (Demmig et al., 1987). En présence du couplage énergétique délocalisé, les zéaxanthines vont être formés en permanence, ce qui provoquerait, en cas de lumière non excessive, une perte inutile de l'énergie emmagasinée. Le couplage localisé, lui, pourrait éviter la stimulation de l'enzyme violaxanthine déépoxydase, et permettre, par là, une utilisation efficace de la lumière absorbée.

1. 1. 5. La photoinhibition

La lumière est le substrat de la conservation de l'énergie en photosynthèse. Cependant, l'excès de lumière est aussi le facteur majeur de stress chez les plantes qui, pour minimiser les risques de dommage induits, ont développé divers mécanismes moléculaires. Ainsi, elles peuvent répondre aux variations de la lumière par un changement de la composition, l'organisation, et la structure de leurs thylacoïdes. Les modes de protections qu'elles adoptent peuvent être soit à long terme, comme l'augmentation de la concentration des PSII (Anderson et al., 1988), soit à court terme, comme le changement dans les états de phosphorylation des antennes des PSII (Anderson, 1986).

Toutefois, une forte illumination des organismes photosynthétiques oxygéniques, entraîne une baisse de la fixation du CO₂, une inhibition du transport d'électrons, et une inhibition du dégagement d'O₂. Ce phénomène est appelé photoinhibition et il vise principalement le transport d'électrons à travers le PSII (Andersson et Styring, 1991). Plusieurs études du mécanisme d'inhibition photo-induite envisagent des lésions provoquées par la sur-réduction du côté accepteur du PSII, ou par la sur-oxydation du côté donneur quand le système d'oxydation de l'eau est perturbé. La figure 6 illustre les événements de la photoinhibition du transport des électrons dans le PSII (Aro et al., 1993).

Du côté accepteur, initialement, la forte illumination conduit à la réduction complète de toutes les plastoquinones disponibles et aussi Q_B, qui quitte alors son site dans la protéine D1. En plus Q_A est réduite. La forte illumination induit de façon continue les réactions primaires de séparation des charges, mais dans une grande fraction des centres, la paire radicale P680⁺Phéo⁻ recombine. Toutefois, la donation d'électrons par la Tyr_Z et le groupement Mn étant très rapide, elle entraîne, à faible rendement quantique, une accumulation de la Phéo⁻. Cette espèce est très réductrice (E_m -610 mV), et peut par la suite réduire Q_A⁻ une seconde fois, conduisant à la formation de Q_A²⁻ qui est un état anormal, et sa formation rend Q_A non fonctionnelle.

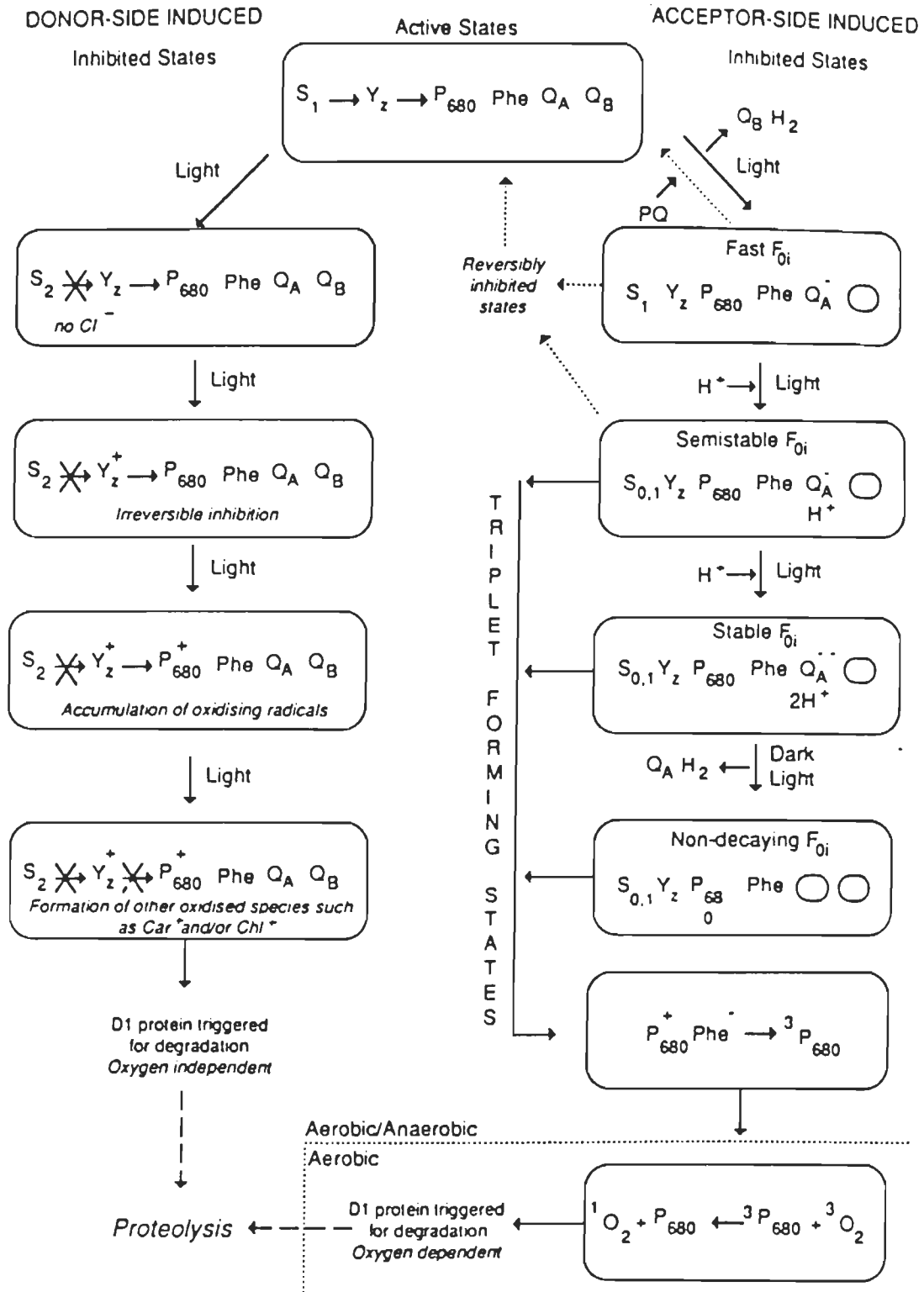


Figure 6 : La photoinhibition du transport d'électrons en conséquence d'une très forte illumination. Aro et al., (1993). "Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover". B.B.A.

Récemment, les conséquences possibles de la double réduction de QA ont été discutées dans le contexte de la photoinhibition (Styring et al., 1990), et une des possibilités intéressantes est que QA^{2-} (ou QAH_2) quitte son site dans la protéine D1. Malgré l'inhibition du transfert d'électrons à partir de la phéophytine, par la double réduction de QA, la réaction de séparation des charges reste fonctionnelle. Cette séparation de charges est, elle aussi, inhibée plus tard dans une réaction lente qui peut être reliée à l'endommagement de la protéine D1.

Contrairement à la photoinhibition due à la sur-réduction du côté accepteur, un mécanisme différent de photoinhibition est impliqué quand les centres du PSII inhibés du côté de l'oxydation de l'eau (fig. 6). Dans ce cas, les réactions du transfert d'électrons deviennent 20-50 fois plus sensibles à la lumière que dans le cas de photoinhibition décrit plus haut. Les études de ce phénomène ont été réalisées sur des thylacoïdes dépourvus de Mn ou de Cl, chez lesquels, le dégagement d'oxygène est inhibé (Jegerschöld *et al.*, 1990). Le mécanisme moléculaire de cette inhibition n'est pas entièrement compris, mais elle est considérée provenir de l'accumulation de radicaux hautement oxydants, et anormalement de longue durée de vie, comme $P680^+$ et/ou Tyr_Z^+ (Blubaugh et Cheniae, 1990).

1. 2. SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE

La spectroscopie photoacoustique (SPA) est la meilleure technique pour quantifier la dissipation thermique de l'énergie lumineuse absorbée par les plantes (Braslawsky, 1986). Avec les mesures de l'effet photoacoustique, seule la chaleur induite par la lumière est détectée. La détection de l'effet photoacoustique date du temps des expériences d'Alexander Graham Bell, John Tyndall, Wilhelm Röntgen et Lord Rayleigh dès 1880. L'histoire de la photoacoustique est détaillée par Rosencwaig (1980). Ce n'est qu'en 1973 que la spectroscopie photoacoustique a commencé à être utilisée dans un grand nombre d'applications comme la caractérisation et l'analyse des substances à haute diffraction, les études non-destructives et *in vivo* de différents matériaux biologiques, la mesure des états de désexcitation des molécules (i.e. état énergétique, rendement quantique) et des durées de vie des intermédiaires des réactions photochimiques.

La théorie générale de l'effet photoacoustique a été résumée dans les publications de Prehn (1979) et Rosencwaig (1980). Le traitement théorique, appliqué à la photosynthèse a été décrit par Malkin et Cahen (1979). Ces auteurs apportèrent un intérêt particulier à cette spectroscopie en introduisant la notion de différence entre les échantillons photochimiquement actifs et inactifs, dont l'émission de chaleur permet de mesurer l'activité photosynthétique, ce qu'ils appelèrent "Emmagasinage de L'Énergie Photochimique" ou EEP. Jusqu'à présent, l'EEP représente le seul paramètre détecté par la PA capable de quantifier directement la désactivation thermique.

1. 2. 1. Méthode photoacoustique

La photoacoustique est une approche récente pour réaliser *in vivo* et *in vitro* de rapides et directes mesures des réactions photochimiques de la photosynthèse (Canaani et Malkin, 1984). Cette méthode est basée sur la détection du relâchement de la chaleur et/ou du dégagement d'oxygène chez les organismes photosynthétiques. Ces derniers diffusent dans la cellule PA avec la même fréquence de modulation que la lumière incidente et créent des changements de pression dans la phase gazeuse autour de l'échantillon.

Pour produire un effet PA, l'échantillon est excité par une source lumineuse conventionnelle, généralement forte, tels des lampes incandescentes à arc ou un laser. La longueur d'onde de l'excitation est sélectionnée par un monochromateur dans la région du tracé engendrant l'ultraviolet, le visible et l'infrarouge proche. Le faisceau de lumière tombant sur l'échantillon est périodiquement interrompu et sa fréquence de modulation peut varier dans une gamme donnée, normalement entre 1 Hz et quelques kHz.

Les changements thermo-induits de la pression peuvent être détectés comme un signal acoustique par un microphone sensible qui transmet le signal à un enregistreur. Dans la plupart des cas, l'échantillon est placé dans un compartiment fermé dont la face supérieure consiste en une fenêtre qui permet la pénétration de la lumière d'excitation. Une fine couche de gaz autour de l'échantillon est nécessaire pour la détection des changements de pression.

Par des mesures de spectroscopie photoacoustique, différentes informations sur la fonction de l'appareil photosynthétique peuvent être obtenues en fonction du temps de mesure qui suit l'absorption initiale de la lumière. Quand les mesures sont faites immédiatement après l'illumination, on obtient des informations sur les processus primaires du transfert rapide de l'énergie à travers le système pigmentaire. Si, par contre, elles sont prises après un temps plus long, on en déduit des informations sur le fonctionnement d'événements plus longs, tels le stockage d'énergie photochimique (perte des électrons à partir des centres réactionnels et transport d'électrons).

L'autre paramètre très déterminant dans les mesures photoacoustiques est l'analyse de profondeur de l'échantillon. D'après la théorie de Rosencwaig et Gersho sur l'effet photoacoustique sur les solides, la profondeur maximale d'un échantillon (L_s) est la profondeur à partir de laquelle l'émission de chaleur est détectée. Cette couche "thermiquement active" est en relation étroite avec la fréquence de modulation utilisée. Plus la fréquence de modulation de la lumière d'excitation augmente, plus la couche de l'échantillon thermiquement active diminue.

1. 2. 2. Application de la SPA à la photosynthèse

L'intérêt de l'application de la spectroscopie photoacoustique à l'étude de la photosynthèse ne cesse d'augmenter. Différents matériaux photosynthétiques peuvent être étudiés par cette spectroscopie. Les travaux dans ce sens ont été surtout axés sur la désexcitation des pigments photosynthétiques. L'étude de ces pigments a été réalisée soit sur des extraits membranaires (vésicules, chloroplastes), soit sur des organismes entiers (feuilles, fruits, algues vivantes ou bactéries).

Les tracés PA sont aussi utilisés comme indicateurs de la dégradation des membranes immobilisées (Carpentier et al., 1987), ou pour caractériser les phases génétiques des plantes (Buschmann et Prehn, 1981) et les états sporadiques dans les cycles bactériens (Somoano 1978). L'application spécifique de cette spectroscopie aux photosystèmes I (Owens et al., 1990) et II (Carpentier et al., 1989), représente un aspect plus fondamental de la recherche en photosynthèse. On a pu aussi étudier plusieurs aspects physiologiques chez les plantes et les bactéries photosynthétiques, telle la détermination des tracés de transition d'états des CCLII (Canaani, 1990; Havaux, 1992), de l'effet des métaux lourds (Ouzounidou, 1993) ou des herbicides (Fuks, 1992).

Avec l'utilisation d'un matériel photosynthétiquement actif, la portion de l'énergie absorbée, qui est stockée en intermédiaires photochimiques, n'est pas relâchée immédiatement en chaleur. La comparaison des signaux émis par les échantillons actifs et inactifs conduit donc à l'évaluation du rendement du stockage d'énergie photosynthétique, appelé aussi "perte photochimique" (Malkin et Cahen, 1979). Un échantillon transféré de l'obscurité à la lumière atteint son maximum d'activité photosynthétique peu de temps après l'illumination. L'augmentation de cette activité est corrélée avec la diminution simultanée de l'émission de fluorescence et de chaleur. Par contre, quand la photosynthèse est inhibée, les émissions de fluorescence et de chaleur augmentent. Du côté thermique, cette augmentation est détectée par la SPA, et reflète la quantité de l'énergie lumineuse absorbée qui est utilisée pour la conversion quantique en intermédiaires photosynthétiques.

L'inhibition d'un échantillon photosynthétiquement actif se fait soit par son incubation en présence d'un inhibiteur, comme le DCMU, ou par la saturation de son activité par une lumière actinique non-modulée de forte intensité. Ce dernier mode d'inhibition permet de réaliser des phases périodiques de saturation et de désaturation.

La lumière actinique utilisée est d'intensité saturante, elle est surimposée au faisceau modulé. Elle provoque la fermeture des centres réactionnels photosynthétiques par la réduction de tous les accepteurs d'électrons de la chaîne de transport d'électrons. L'emmagasinement de l'énergie photosynthétique est alors inhibé (Lasser et al., 1980; Yamagishi et Katoh, 1987; Buchmann, 1987 et Popovic et al., 1987). Cette approche a l'avantage d'utiliser le même échantillon comme matériel actif et inactif. Le stockage d'énergie déterminé par cette procédure a été corrélé avec le transfert d'électrons et l'émission de fluorescence (Carpentier et al., 1988 a). Ce paramètre a été aussi appliqué à l'évaluation du niveau des dommages causés aux membranes thylacoïdiennes natives et immobilisées (Carpentier et al., 1988 b).

Pour l'émission thermique, la détection de l'emmagasinement d'énergie photosynthétique, EEP, est d'une utilité particulière (Carpentier et al., 1983 b, 1984). Dans les mesures du stockage de l'énergie photosynthétique, le signal PA est la différence entre le signal PA maximal, obtenu par la fermeture de tous les pièges du centre réactionnel sous l'effet de la lumière actinique non-modulée saturante, et le signal obtenu en absence de cette lumière, où une fraction des centres restent ouverts. Cette différence de l'émission thermique, en présence des pièges ouverts, est associée à la formation d'équivalents rédox stables emmagasinés dans les éléments du transport d'électrons.

Les traitements mathématiques de l'EEP est présenté en détail dans les travaux de Malkin et Cahen (1979) et Carpentier et al. (1989). Ainsi, l'emmagasinement de l'énergie photosynthétique est calculée comme:

$$EEP = [(Q_m - Q_c) / Q_m] \times 100 \quad (1)$$

Q_c représente le signal photoacoustique, induit par la lumière modulée et qui est exprimé par l'équation suivante:

$$Q_c = a \cdot (Nh\nu - \phi_p \Delta E_p) \cdot I \quad (2)$$

Où $Nh\nu$ est le rendement photonique total absorbé, ϕ_p le rendement quantique des réactions photochimiques, ΔE_p la différence d'énergie par mole de produit formée, et I l'intensité de la lumière absorbée en Einstein par unité de volume par unité de temps. La constante a est une propriété thermique intrinsèque de l'échantillon. Le terme $\phi_p \Delta E_p$ représente le rendement photosynthétique.

L'addition du faisceau actinique non-modulée sature totalement la photosynthèse, et le signal d'emmagasinement de l'énergie représente alors toute l'énergie absorbée, soit:

$$Q_m = a \cdot (Nh\nu) \cdot I \quad (3)$$

L'EEP, qu'on note aussi ϕ'_r est exprimé comme suit :

$$EEP = \phi'_r = (\phi_p \Delta E_p) / Nh\nu \quad (4)$$

En photosynthèse, les paramètres les plus importants du signal photoacoustique sont donc Q_m et Q_c . Ce principe a pris naissance, comme nous l'avons déjà indiqué, de la théorie PA des échantillons photosynthétiquement actifs (Malkin et Cahen, 1979). Il a été largement utilisé par la suite dans le but de caractériser de façon sélective les emmagasinsages de l'énergie au niveau des différents composants du système photosynthétique de transfert d'électrons. Ainsi, les mesures effectuées à des longueurs d'ondes différentes ont permis, par exemple, la détermination du stockage d'énergie dans les membranes enrichies en PSII où les quinones représentent les accepteurs finaux, ou dans les complexes du PSI où la réduction de FA-FB représente le mode de saturation du stockage d'énergie (Owens et al., 1990).

Contrairement au signal photoacoustique dans les feuilles, le signal émanant des thylacoïdes isolés n'est composé que par la contribution photothermique (Carpentier et al., 1984, 1989; Canaani, 1986). Le dégagement d'oxygène ou sa capture dans la cellule PA peut modifier la pression du gaz autour de l'échantillon et contribue au signal acoustique total. Cependant, chez les thylacoïdes, la participation de l'oxygène est négligeable à la phase angulaire du signal thermique et n'est pas tenue en compte dans l'émission thermique.

Finalement, notons que le signal PA a été récemment déterminé simultanément avec le signal d'émission de fluorescence (Carpentier et al., 1991). La corrélation entre ces deux spectroscopies a été introduite pour la première fois par Malkin en 1987 qui a pu corréler le pulse initial d'oxygène avec l'augmentation initiale de la fluorescence durant 1-2 sec. Depuis, différentes méthodes et développements de cette corrélation ont été mis au point notamment par l'équipe de R. Carpentier et grâce à l'appareil mesurant simultanément les émissions de fluorescence et photoacoustique. Pour pouvoir mieux comprendre cette corrélation et pouvoir en tirer le meilleur profit, une étude assez détaillée des bases biophysiques de l'émission de fluorescence et ses atténuations s'avère primordiale. La troisième section de ce premier chapitre sera donc consacrée à l'étude de la spectroscopie de fluorescence.

1. 3. SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE

La fluorescence de la chlorophylle a, émise par les plantes vertes, reflète leur activité photosynthétique de manière complexe. Les utilisations récentes des techniques de mesure de fluorescence ont fait de cette méthode un important outil dans la recherche fondamentale et appliquée à la physiologie des plantes. L'utilisation de la fluorescence chez les feuilles intactes a représenté pendant longtemps l'unique moyen non intrusif pour juger de l'état physiologique des plantes. Cette spectroscopie a été aussi particulièrement efficace pour l'étude des fractionnements membranaires tels les thylacoïdes, les centres réactionnels et les complexes collecteurs de lumières.

1. 3. 1. Les bases biophysiques de l'émission de fluorescence

Le rendement de fluorescence émise, F , est proportionnel au flux de la lumière absorbée, I_a , et au rapport de la constante du taux de fluorescence, K_F , sur la somme des constantes, $\sum k_i$, de toutes les réactions compétitives qui résultent du retour de la molécule de chlorophylle excitée à son état fondamental. Les plus importantes de ces réactions sont la réaction photochimique (k_P), la désactivation thermique (k_D), et le transfert de l'énergie d'excitation aux pigments non fluorescents (k_T).

$$F = I_a \cdot k_F / \sum k_i \quad (5)$$

$$\Phi F = F / I_a \quad (6)$$

$$\Phi F = k_F / (k_F + k_D + k_T + k_P) \quad (7)$$

Comme proposé par Duysens & Sweers (1963) et ensuite élaboré par Butler et ses coéquipiers (1977, 1978), le rendement de fluorescence est minimal (ΦF_0) quand tous les centres réactionnels sont dans un état actif, qu'on dit "ouvert". Un haut rendement photonique demande que $k_P \gg k_F + k_D + k_T$, cependant, quand Q_A est totalement réduite, l'excitation de P680 ne peut résulter en une séparation de charges stable ($k_P = 0$), alors le rendement maximal de la fluorescence (ΦF_m) est obtenu.

Par approche similaire, le rendement potentiel de la réaction photochimique du PSII est obtenu comme:

$$\Phi_P = k_P / \sum k_i = (\Phi_{F_M} - \Phi_{F_0}) / \Phi_{F_M} \quad (8)$$

$$= (F_M - F_0) / F_M = F_V / F \quad (9)$$

où F_M est la fluorescence totale maximale et F_V est la fluorescence variable maximale. L'augmentation de F_0 à F_M reflète la réduction de Q_A (Baker et al., 1987), toutefois, l'émission de fluorescence est aussi influencée par divers mécanismes d'atténuation non photochimique.

1. 3. 1. 1. Origine de l'émission de fluorescence

Au moment où il est admis par la plupart que la fluorescence au niveau F_0 est émise par les molécules de chlorophylle a des antennes, l'origine de la fluorescence variable a été le sujet de fortes controverses. Butler a postulé que toute la fluorescence provient des antennes (1977, 1978). Klimov et al (1981) ont établi que la fluorescence variable résulte de la recombinaison de la paire radicale $P680^+Phéo^-$ dans les centres réactionnels fermés. Breton (1982), lui, a attribué la bande d'émission à 690 nm observée à 77 K à l'émission de $Phéo^*$. Cependant, contrairement à Klimov et Breton, Schatz et al (1988) ont déduit que dans les centres réactionnels fermés, la séparation primaire des charges est fortement restreinte par l'effet électrostatique de Q_A^- . Des conclusions similaires ont été apportées par Schlodder et Brettel (1988) qui affirment que le rendement quantique de séparation primaire des charges, et donc de la recombinaison, paraît être faible en présence de Q_A^- .

Toutefois, d'après plusieurs études spectroscopiques, on peut dire que la recombinaison de charges est un moyen majeur de désactivation qui tient place seulement dans les complexes des centres réactionnels isolés qui sont dépourvus de liaisons quinones. Dans les systèmes intacts, la présence de Q_A favorise le transfert d'électrons vers cet accepteur. Quand Q_A est réduite, le taux de séparation de charges est supposé diminuer fortement, ce qui montre que *in vivo*, une grande partie de la fluorescence émane du système antennaire (Van Dorssen et al, 1987).

1. 3. 1. 2. Induction de fluorescence

Quand l'appareil photosynthétique est adapté au noir, Q_A est normalement totalement oxydée. Si on lui applique une lumière continue, on observe une augmentation de F_0 à F_M , qui représente la fluorescence variable (F_v) et qui est reliée à la réduction de Q_A (Duysens et Sweers, 1963). Le signal d'induction représente un processus polyphasique complexe qui dépend dans ses détails des conditions expérimentales.

Quand la densité du flux photonique est suffisamment élevée pour que la vitesse de réduction de Q_A devienne plus rapide que celle de son oxydation, l'état F_M est atteint. Toutefois, à un temps donné durant la transition de F_0 à F_M , la fluorescence variable n'est pas directement proportionnelle à l'état rédox de Q_A . Pour une population qui contient à la fois des centres ouverts et des centres fermés, la fluorescence variable est plus faible que la population des Q_A oxydées supposée, probablement à cause du transfert d'énergie d'excitation des centres fermés aux centres ouverts.

De plus, l'hétérogénéité du PSII influence fortement la courbe de transition, vu que le transfert d'énergie paraît être possible entre les unités du $PSII_\alpha$ mais non entre celles du $PSII_\beta$. D'autre part, comme les électrons passent de Q_A^- via Q_B à PQ, l'augmentation de fluorescence est aussi reliée à la réduction de ces transporteurs d'électrons, et a été en fait utilisée pour déterminer la taille du pool de plastoquinone (Briantais et al., 1986). Il a été montré que l'oxydation de PQ joue le rôle d'atténuateur de fluorescence (Vernotte et al., 1979). C'est pourquoi, la vraie valeur de F_M ne peut être atteinte que si le pool de PQ devient totalement réduit.

Le signal typique d'induction de fluorescence montre une augmentation relativement rapide de F_0 à F_I (I=inflexion), suivie par un plateau ou "dip" (F_D) et une augmentation plus lente au pic (F_P) ou à la fluorescence maximale (F_M). F_P est plus bas que F_M quand la réduction totale de Q_A n'est pas achevée. La relaxation de la fluorescence dans le noir peut être utilisée pour étudier les cinétiques du transfert d'électrons de Q_A à Q_B (et PQ) ou plus généralement pour étudier les cinétiques de réoxydation de Q_A^- .

1. 3. 2. Le "quenching" de fluorescence

Le signal typique d'induction de fluorescence dans les chloroplastes *in vivo* et en lumière continue est connu comme le phénomène de Kautsky (Briantais et al., 1986). Normalement, une atténuation polyphasique du signal, nommée plus généralement "quenching", est observée. Elle est parfois entrecoupée par un ou quelques pics jusqu'à ce que le niveau d'état stable final de fluorescence, ou fluorescence "terminale", F_T , soit atteint, en l'espace de quelques minutes. Le taux du quenching est exprimé par le coefficient de quenching ($0 < q < 1$) indiquant la proportion quenchée du maximum de fluorescence. S'il n'y a pas d'autres indications, q est spécifiquement référé au quenching de la fluorescence variable maximale:

$$q = (F_V - F_V') / F_V \quad (10)$$

où F_V' représente la fluorescence variable à l'état quenché. Cependant, q peut être aussi utilisé pour décrire l'atténuation au niveau F_0 ou F_M .

Divers mécanismes contribuent au quenching de la fluorescence (Krause et al., 1982). La résolution des composantes du quenching fournit d'importantes informations sur l'état fonctionnel de l'appareil photosynthétique, et plus spécifiquement sur l'efficacité du PSII. Comme il a été mentionné au début de ce chapitre, le rendement de fluorescence est abaissé à cause de la compétition de la réaction photochimique avec les autres moyens de désexcitation. Un tel quenching photochimique dépend de la présence de Q_A à l'état oxydé. Le coefficient du quenching photochimique, q_P , dénote la proportion des excitons capturés par les pièges ouverts et qui vont être convertis en énergie chimique dans le centre réactionnel du PSII. C'est la réoxydation de Q_A^- qui cause donc le quenching de la fluorescence et l'augmentation des valeurs de q_P .

Toutefois, le rendement de fluorescence peut être aussi atténué par des mécanismes qui ne sont pas directement reliés à l'état rédox de Q_A . Un tel quenching est qualifié de nonphotochimique et il est appelé q_N . Ce quenching peut être causé, *in vivo*, sous des conditions physiologiques, par trois mécanismes majeurs:

- 1- Le quenching "énergie-dépendant" (q_E) causé généralement par l'acidification intrathylacoïdienne et amplifié par le cycle des xanthophylles.
- 2- Le quenching relié à la transition d'état "state1-state2" (q_T) contrôlé par la phosphorylation des CCLII.
- 3- Le quenching "de photoinhibition" (q_I).

En principe, la contribution de diverses composantes au quenching total de fluorescence peut être résolue en traitant leurs cinétiques de relaxation. Dans les chloroplastes isolés, le quenching photochimique et nonphotochimique étaient d'abord résolus par addition de DCMU en présence de lumière (Krause et al., 1982). Suite à ce traitement, la réversion du quenching s'est faite en deux phases, une phase rapide de $t_{1/2} = 2$ sec, représente la diminution de q_P due à la réduction des Q_A , et une phase lente de $t_{1/2} = 15$ sec, indique la réversion de q_N dont la composante majeure est le quenching énergie-dépendant. Des études plus détaillées ont révélé que la phase de la relaxation de q_N observée dans ce cas est très rapide et ne dépasse pas 1 min. Ce q_E semble être contrôlé par une augmentation de la désactivation thermique (Demmig-Adams, 1990).

1. 3. 2. 1. Mécanisme du quenching "énergie-dépendant"

L'énergisation du thylacoïde causée par la formation d'un $\Delta p H$ transmembranaire peut conduire au quenching d'environ 90% de F_V . Le taux de $\Delta p H$ ou q_N est linéairement relié à la concentration intrathylacoïdienne de H^+ (Briantais et al., 1979). A partir de l'analyse de la fluorescence à 77 K, il a été conclu que ce quenching est basé sur l'augmentation de la constante du taux de désactivation thermique dans le PSII, cependant, le mécanisme moléculaire de ce quenching est encore inconnu.

Quoique la formation de ΔpH est strictement requise pour la formation de q_E , d'autres facteurs semblent être impliqués comme l'antimycine A et les zéaxanthines. Le mécanisme du quenching relié aux zéaxanthines est généralement contrôlé par le cycle des xanthophylles qui entrent en interaction avec les chlorophylles de l'antenne. D'après Krause et Weis (1991) cette interaction résulte en une augmentation de l'émission de chaleur .

La relation entre la concentration de H^+ et q_E , en fait, n'est pas nécessairement constante. Elle peut être substantiellement influencée par des facteurs de stress tels la chaleur et le froid. En présence d'amines tertiaires, le gradient de protons et le taux de phosphorylation diminuent, indiquant un découplage, alors que le contrôle photosynthétique du transport d'électrons et q_E ne sont pas affectés (Laasch et Weis, 1989).

Il est encore controversé d'affirmer l'origine de q_E . Dans le modèle de Weis & Berry (1987) déduit à partir de données détaillées sur q_P et q_E dans les feuilles et dans une version modifiée de ce modèle (Weis et al., 1990), une forme "énergisée" du PSII, photochimiquement inactive et non fluorescente semble engendrer un processus qui augmente fortement la dissipation de l'énergie. L'existence de ces centres dépend probablement de la concentration des H^+ intrathylacoïdiens et de la balance rédox dans les centres réactionnels des PSII. Ce concept a été pourtant opposé par Horton et Hague (1988) qui en partant de l'effet différentiel de l'antimycine A sur le quenching de fluorescence et le ΔpH , ont conclu que l'efficacité du PSII est contrôlée en outre par des processus photochimiques cycliques alternatifs.

Comme mécanisme possible du quenching ΔpH -dépendant dans les centres, la limitation de la donation d'électrons au $P680^+$, causée par l'acidification, a été aussi suggérée (Schreiber et Neubauer, 1990). Les évidences pour la limitation du côté donneur du PSII à pH faible proviennent des études spectroscopiques sur la résolution du temps de réduction de $P680^*$. En effet, sous des conditions de réduction modérée, ou en présence d'un donneur spécifique d'électrons, aucun quenching n'a été observé dans les particules du PSII (Krieger et Weis, 1990).

Un modèle alternatif qui relie encore le quenching à la baisse de l'efficacité du PSII a été proposé par Genty et al (1990). Ce modèle présume que le quenching de fluorescence se produit dans les antennes. Le quotient des paramètres de la fluorescence à l'état quenché $F_V' / F_M' = (F_M' - F_0') / F_M'$, est pris comme mesure de l'efficacité quantique des centres ouverts. Une telle supposition ne pourrait pas être valide pour deux populations des centres, comme proposé par Weis et Berry (1987).

Tout récemment, une étude de Ruban et al. (1992) a attribué le mécanisme de q_E à des changements structuraux initialisés par la différence de ΔpH et reliés à l'agrégation des CCLII dont la majeure partie constitue le complexe de la zéaxanthine époxydase (Wieslaw et al., 1993). Cette suggestion a été déjà avancée dans une étude de Gilmore et Yamamoto en 1992. En outre, l'analyse spectroscopique des complexes collecteurs de lumière montre clairement qu'il existe une très forte corrélation entre le degré d'agrégation de ces complexes et le quenching de fluorescence énergie-dépendant (Ruban et al., 1994; Mulineaux, 1993; Ruban et Horton, 1992). De nos jours, aucune étude ne nous fournit les preuves définitives qui peuvent nous permettre de trancher entre l'une ou l'autre de ces différentes suggestions, c'est la raison pour laquelle il faut considérer avec beaucoup d'attention l'interprétation de tout résultat traitant de ce phénomène.

1. 3. 2. 2. Les aspects physiologiques de q_E

Le quenching de fluorescence est en relation étroite avec la régulation de la photosynthèse. Les phénomènes du quenching sont fortement influencés par les stress environnementaux. Dans les feuilles gardées en lumière faible, q_P est élevé (> 0.9) et il conduit à une fonction optimale de piégeage des électrons. En augmentant la PFD, une proportion importante de l'énergie lumineuse absorbée n'est pas utilisée dans les processus photosynthétiques. Une augmentation dans le ΔpH peut contrôler q_T et favoriser q_E, une forte augmentation de q_N (principalement de q_E) est observée. La réponse de q_E, indiquant une augmentation de la dissipation nonphotochimique d'énergie, a été suggérée représenter une propriété dynamique de la membrane du thylacoïde (Weis et Berry, 1987).

Le mécanisme de q_E est supposé fournir un moyen contrôlé de la désactivation de l'excitation excessive des pigments, servant comme fonction protectrice contre les effets adverses de la lumière forte. Il a été expérimentalement prouvé qu'en présence d'un haut q_E , la photoinhibition diminue (Krause et Behrend, 1986). La désactivation thermique, qui se produit quand q_E est grand, augmente probablement la fraction des centres ouverts présents à l'état stationnaire. C'est seulement quand q_E est saturé, que Q_A devient largement réduite (q_P diminue fortement). Sous de telles conditions, c'est q_I qui augmente (Horton et Hague, 1988).

1. 4. BUT ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

En termes généraux, le but principal de cette étude réside en la détermination des paramètres physiologiques responsables de la régulation de l'émission thermique dans les membranes photosynthétiques. Pour réaliser ce but, nous allons mener une étude comparative de l'émission thermique avec l'émission de fluorescence mesurée simultanément sur un même échantillon. Cette méthodologie nous permettra de déterminer et de mieux comprendre les variations simultanées que subissent ces deux moyens de dissipation de l'énergie d'excitation, ainsi que d'essayer d'élucider quelques aspects encore obscurs de la réponse membranaire aux fortes luminosités.

Comme nous avons mentionné auparavant (la section 1.3), la régulation de l'émission de fluorescence se fait à deux niveaux différents:

1- Un niveau photochimique contrôlé par le taux de réduction des plastoquinones et qui peut être tout à fait comparable au taux d'emmagasinement de l'énergie photosynthétique mesuré par la spectroscopie photoacoustique.

2- Un niveau non-photochimique principalement énergie-dépendant et dont le mécanisme et la régulation sont encore inconnus. Il semble toutefois, et d'après l'ensemble des chercheurs, se traduire par une variation de la désactivation non-radiatives des pigments excités sous forme de chaleur.

Partant de ces deux points, et pour élucider la question de la régulation thermique par rapport à la fluorescence, nous nous sommes fixés les objectifs suivants:

a) - Etude de la régulation non-photochimique de l'émission thermique par différents traitements sélectifs de l'énergisation de la membrane et de l'acidité de l'espace intrathylacoïdien.

b) - Etude de la régulation photochimique de l'émission thermique principalement par l'étude de la photoinhibition de différents fractionnements membranaires.

1. 4. 1. Régulation non-photochimique de l'émission thermique

Cette étude portera d'abord sur l'étude de l'effet de la variation du pH luminal sur les émissions simultanées de fluorescence et thermique. Ainsi, nous allons utiliser la tentoxine qui est un inhibiteur de l'ATPsynthase et qui provoque donc une augmentation de la concentration des protons dans le lumen et donc une augmentation du gradient électrochimique de la membrane. Pour avoir l'effet contraire, c'est à dire une diminution du gradient transmembranaire des protons, nous allons utiliser un mélange de deux découpleurs classiques, la nigéricine et la valinomycine en présence de K^+ .

Pour mieux caractériser l'origine du quenching non photochimique énergie-dépendant la variation dans les tracés, nous allons procéder à la variation sélective de l'acidité du lumen en gardant le gradient électrochimique de proton le plus stable possible. Cette manipulation sera rendue possible grâce à l'utilisation de deux découpleurs, la procaine qui est un anesthésiant local agissant au niveau du cytochrome b_6f , et DCCD qui est un inhibiteur affectant l'extrusion des protons dans le lumen. Ces deux produits, n'ayant aucun effet sur le ΔpH , nous permettront de déterminer l'effet du pH luminal indépendamment de l'énergisation de la membrane.

Le troisième point que nous allons exploiter dans cette étude concerne la régulation de l'émission thermique par le cycle des xanthophylles qui est largement connu pour être un amplificateur du quenching non-photochimique de fluorescence. Cette partie de notre étude sera basée sur l'étude de l'effet de différentes concentrations d'ascorbate qui est un cofacteur indispensable à l'activation de ce cycle. Les effets du cycle des xanthophylles sur la régulation thermique ont été souvent postulés, mais jamais étudiés.

Finalement, pour différencier entre le quenching énergie-dépendant et le quenching de photoinhibition, nous allons étudier l'effet de la perturbation du complexe de l'oxydation de l'eau par l'intermédiaire du FCCP, un agent ADRY qui est capable d'induire une photoinhibition non-photochimique malgré la petite durée d'illumination qui est de 1 min. L'utilisation de ce produit nous permettra aussi de déterminer l'effet des agents ADRY sur la régulation thermique.

1. 4. 2. Régulation photochimique de l'émission thermique

Outre le PSII qui est le site principal de l'émission de fluorescence, l'émission thermique semble être contrôlée par d'autres constituants membranaires. Le but de cette étude sera donc la détermination des ces constituants, ainsi que leur taux de participation dans la régulation de l'émission thermique. La méthodologie que l'on va utiliser pour cette étude consistera en la photoinhibition de trois types d'échantillons.

1- Des thylacoïdes isolés permettant une évaluation globale du taux de l'émission thermique une fois que toute la fluorescence variable éliminée.

2- Des membranes enrichies en PSII permettant, dans les mêmes conditions que les thylacoïdes, la détermination de l'effet de l'extraction des PSI.

3- Des PSII dépourvus de complexes d'oxydation de l'eau permettant finalement la détermination de la participation des unités PSII β dans le signal photoacoustique.

Par l'utilisation de ces deux approches différentes, à savoir l'étude de la régulation non photochimique et photochimique de l'émission thermique, nous espérons cerner de très près la question, combien délicate, de la régulation de l'excès d'énergie d'excitation dans les membranes photosynthétiques. Cette étude nous permettra aussi d'envisager quelques mécanismes de la régulation du quenching non-photochimique de la fluorescence et le rôle exact que joue le cycle des xanthophylles dans ce dernier. Les éléments nouveaux que nous visons à éclaircir se basent surtout sur la variation de l'émission thermique en comparaison avec la variation déjà bien établie dans la littérature pour la fluorescence.

CHAPITRE II

MATERIEL ET MÉTHODES

2. 1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons ont été préparés à partir de feuilles d'épinard achetées au supermarché local. Toutes les manipulations ont été réalisées dans la lumière verte avec des solutions mères préparées le jour même. La température a été fixée à 4 °C par l'utilisation de la glace ou de la chambre froide.

2. 1. 1. Préparation des thylacoïdes

100 g de feuilles fraîches dont on a tiré les nervures sont lavées deux fois dans de l'eau et de la glace. Une fois séchées, elles sont broyées dans un blender dans 300 ml d'une solution (1) qui contient 330 mM Sorbitol, 5 mM $MgCl_2$ et 20 mM Tes-NaOH (pH 7.5). L'homogénat est filtré à travers 8 épaisseurs de coton fromage et immédiatement centrifugé (à l'aide d'une centrifugeuse Sorvall RC-5B de Dupont Instruments) à 2000 x g pendant 1 min à 4 °C. Les culots obtenus sont resuspendus chacun dans 2 ml de tampon 1/20 de la solution (1) pour libérer les thylacoïdes des enveloppes des chloroplastes. La suspension obtenue est centrifugée pendant 1 min à 4300 x g, puis resuspendue dans un troisième tampon contenant 330 mM Sorbitol, 50 mM Tes-NaOH (pH 7.5) et 2 mM $MgCl_2$. L'extrait des thylacoïdes est par la suite homogénéisé dans un tube Wheaton et ramené à une concentration de 2 mg ml⁻¹. La concentration de la chlorophylle est déterminée par la méthode de Arnon (1949). Les thylacoïdes ainsi obtenus sont utilisés le jour même ou sont gardés dans l'azote pour leur utilisation ultérieure.

2. 1. 2. Préparation des PSII

Comme pour les thylacoïdes, 100 g de feuilles d'épinard sont lavées, séchées, coupées puis broyées dans un blender avec 300 ml de tampon composé de 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.6), 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.4 M Sorbitol, 300 µl PMSF et 0.1 % ascorbate. L'extrait obtenu est filtré dans 8 épaisseurs de coton formage puis immédiatement centrifugé pendant 8 min à 2000 x g. Les culots sont resuspendus dans un tampon constitué de 50 mM Tricine-NaOH (pH 7.6), 10 mM NaCl, 5mM MgCl₂ et 0.1% Ascorbate. Après avoir bien homogénéisé le mélange obtenu, il est centrifugé pendant 8 min à 2000 x g. Le culot est lavé par un tampon composé de 20 mM Mes-NaOH (pH 6.2), 15 mM NaCl et 10 mM MgCl₂. l'extrait est par la suite ajusté à 1 mg/ml avec un volume de tampon de lavage et de triton 4%. Il est placé par la suite dans un bac noir avec de la glace et incubé pendant 20 min avec agitation, et ensuite transféré dans deux tubes à centrifuger, et chaque moitié est additionnée par la même quantité de tampon de lavage. Il est remis dans la centrifugeuse pendant 10 min à 3600 x g. Cette fois, c'est le surnageant qui est récupéré pour être recentrifugé pendant 30 min à 36 600 x g. Finalement, le culot recueilli est resuspendu dans environ 1ml de tampon de lavage. Après avoir déterminé de nouveau la quantité de chlorophylle présente dans l'extrait, la concentration finale de chlorophylle est ramenée à 2 mg ml⁻¹ dans leur tampon de lavage.

2. 1. 3. Extraction des protéines extrinsèques

Les protéines du complexe de dégagement d'oxygène sont extraites à partir des particules de PSII préparés préalablement (section 2. 1. 2). Ces PSII sont incubés volume/volume à 4 °C pendant 30 min, en agitation continue et dans le noir, dans une solution qui contient 2 M NaCl dans 50 mM Tris (pH 8.0). Ils sont par la suite centrifugés toujours à 4° C pendant 30 min à 38 700 x g. Ainsi, les protéines extrinsèques et les ions Mn extraits sont éliminés avec les surnageants. Les culots, contenant uniquement des PSII dépourvus de complexe de dégagement d'oxygène, sont resuspendus dans un tampon de 20 mM Mes-NaOH et l'extrait obtenu est utilisé le même jour après avoir ramené sa concentration à 2 mg ml⁻¹ dans leur tampon de lavage.

2. 2. TRAITEMENTS DES ÉCHANTILLONS

2. 2. 1. Addition des découpleurs et inhibiteurs

Pour l'étude de la régulation non photochimique des émissions simultanées de fluorescence et de chaleur, nous avons utilisé, toujours en concentration finales, 0.1 μM de tentoxine, 5 μM de nigéricine, 5 μM de valinomycine en présence de K^+ , 4 μM FCCP, 0.5 mM DCCD, 5 mM de procaine et de 0 à 60 mM d'ascorbate.

Toutes ces concentrations ont été choisies pour permettre le maximum de rendement photosynthétique tout en fournissant l'effet spécifique désiré. Ces concentrations ont été puisées dans la littérature et sont conformes aux études menées habituellement pour l'étude du quenching non photochimique de l'émission de fluorescence.

En outre, tous les produits ont été dilués dans l'acétone 80%, et les solutions mères ont été préparés de façon à n'utiliser qu'un volume de 1% par rapport au volume final de l'échantillon. Ce qui nous permet de conserver chlorophylle intacte et d'éviter des effets indésirables dans la membrane.

2. 2. 2. Photoinhibition

La photoinhibition des différentes préparations a été réalisée à 10 μg de chlorophylle/ ml de tampon. 25 ml de chacune des différentes solutions ont été transférés dans des flacons de 2 cm d'épaisseur puis transférés dans un réfrigérateur qui garde la température constante à environ 4° C. les flacons ont été séparés de la source de lumière par la même épaisseur d'eau glacée renouvelée chaque 2 min. Les échantillons ont été illuminés par une lumière blanche de 250 mW cm^{-2} en agitation magnétique continue. Les échantillons contrôles ont été dilués de la même façon et gardés dans le noir et à 4° C. Par la suite, tous les échantillons ont été centrifugés à 4300 x g pendant 3 min pour les thylacoïdes et à 36 700 x g pendant 30 min pour les particules des PSII et les PSII dépourvus du complexe de dégagement d'oxygène. Les culots obtenus pour chaque type de préparation ont été resuspendus dans leurs tampons de lavage respectifs et leurs concentrations ont été ramenées à 2 mg/ml.

PRODUITS UTILISÉS	CONCENTRATIONS	RÔLE PRÉSUMÉ
Tentoxine	0.1 μ M	Inhibiteur de l'ATPsynthase
Nigérocine et Valinomycine	5 μ M	Découpleurs généraux
Procaine	5 mM	Découpleur au niveau du cytochrome b6f
DCCD	0.5 mM	Inhibiteur agissant au niveau des CCLII
Ascorbate	0-60 mM	Réducteur des violaxanthines
FCCP	4 μ M	Inhibiteur du complexe d'oxydation de l'eau

Tableau 1 : Tableau Récapitulatif des différents inhibiteurs et découpleurs utilisés dans cette étude, leurs concentrations et leurs sites d'action respectifs. Les concentrations données sont considérées pour l'échantillon final juste avant la mesure en tenant compte des pertes qui surviennent lors de la filtration de l'échantillon.

2.3. MÉTHODOLOGIE

2.3.1. Mesure de dégagement d'oxygène

L'activité photosynthétique de tous les échantillons, avec et sans addition et avant chaque manipulation, a été vérifiée par l'électrode de Clarck. La mesure de la quantité d'oxygène dégagée est détectée par le nombre de μmol d'oxygène qui passe à travers la membrane de l'électrode par heure par mg de chlorophylle de l'échantillon. Toutes les mesures ont été réalisées dans un bain thermostaté à 22 °C avec 15 μl d'extrait à 2 mg/ml de chlorophylle dilués dans 3 ml de tampon contenant 1 mM NaCl et 0.5 mM MgCl_2 et 20 mM Mes-NaOH (pH 6.5), en présence de 600 μM de DCBQ comme accepteur d'électrons, ce qui nous ramène à 10 μg de chlorophylle par ml de solution de mesure. Les échantillons ont été illuminés par une lumière blanche de 350 mWcm^{-2} .

2.3.2. Mesure photoacoustique et de fluorescence

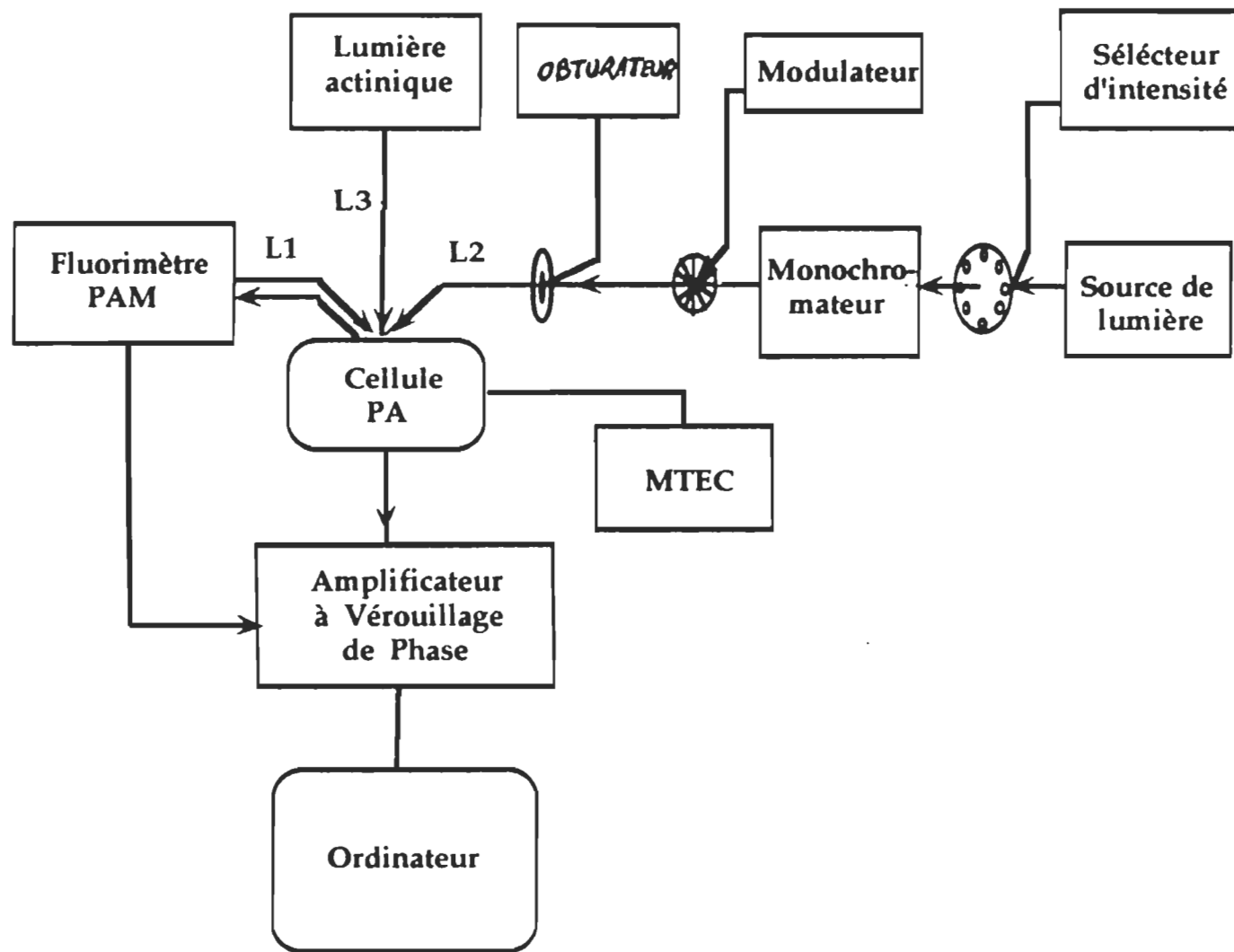
2.3.2. Mesure photoacoustique et de fluorescence

2.3.2.1. Description de l'appareil

L'appareil que nous avons utilisé est une combinaison d'un spectromètre photoacoustique et d'un fluorimètre. Un schéma sommaire de cet appareil est présentés dans la figure 7.

La partie photoacoustique est formée essentiellement d'une partie optique qui détermine le trajet et le contrôle de la lumière d'excitation photoacoustique, et de la cellule photoacoustique proprement dite. Le faisceau de lumière photoacoustique est produit par une lampe au xénon de 150 W (ILC Technology, Sunnydale, CA). L'intensité de ce faisceau est déterminée par son passage à travers une des huit filtres de densité neutre d'indices différents portées par un disque rotatif. Cette intensité est fixée à 4.2 Wm^{-2} . Le faisceau passe immédiatement dans un monochromateur [Photon Technology International (Prinstone, NY), modèle PT1 01-001 SF] dont la longueur d'onde est fixée à 680 nm, elle nous permet d'induire une lumière optimale pour la photosynthèse.

Figure 7 : Schéma représentatif de l'appareil de mesure qui consiste en la combinaison d'un spectrophotomètre photoacoustique et d'un fluorimètre. Les flèches représentent le trajet des différentes lumières qui sont L1 : Faisceau modulé du fluorimètre PAM, de très faible intensité, 680 nm et de 1.6 kHz et 100 kHz. L2 : Faisceau modulé de mesure photoacoustique, de 4.2 Wm^{-2} , 680 nm et 35 Hz. L3 : Faisceau saturant de lumière non modulé, de 180 Wm^{-2} et qui arrive dans la cellule sous forme de pulses périodiques. La constante du temps de l'amplificateur à verrouillage de phase est de 30 ms.



A sa sortie du monochromateur, le faisceau de mesure est modulé suite à son passage à travers un disque métallique rotatif comportant 10 fentes. La vitesse de rotation de ce disque est contrôlée par un modulateur (Boston Electronics, Brookline, MA). Il traverse par la suite un diaphragme dont l'ouverture est contrôlée par ordinateur afin de déterminer le moment exact du passage et de l'arrêt du faisceau de mesure qui forme une lumière de fond pour toute la durée de l'expérience. Finalement, le faisceau de mesure photoacoustique passe dans un filtre pour être acheminé dans un tronc commun aux autres lumières arrivant dans la cellule photoacoustique.

Comme nos mesures concernent l'activité photosynthétique, un faisceau saturant la photosynthèse est surimposé au faisceau de mesure photoacoustique modulé. Ce faisceau provient d'une ampoule halogène (Walz KL1500). C'est un faisceau de lumière blanche, continu et dont l'intensité est ajustée à environ 180 Wm^{-2} . Dans nos expériences, il arrive périodiquement dans la cellule et sa durée est contrôlée par ordinateur. L'effet chauffant du faisceau saturant est minimisé par un filtre placé à sa sortie, et il est tout à fait éliminé par un autre filtre placé à l'entrée de la cellule photoacoustique.

La cellule photoacoustique, qui forme donc le cœur de cet appareil, est composée de deux parties: (i) une section supérieure qui porte la fenêtre par laquelle la lumière passe jusqu'à l'échantillon. (ii) une partie inférieure qui forme la base de la cellule photoacoustique et qui supporte un bras porte échantillon amovible et un microphone. Pour détecter les changements de la pression dans le gaz environnant l'échantillon, la cellule est fermée hermétiquement grâce à un levier puis une valve. L'intensité du signal et le gain de la cellule sont contrôlés par un moniteur relié à la cellule (MTEC).

La deuxième partie de cet appareil et qui est formée par le fluorimètre PAM (pour Pulse amplitude modulated) (Walz, Effeltrich, FRG). Ce fluorimètre émet une lumière d'excitation dans le rouge lointain de très faible intensité. Le faisceau d'excitation de fluorescence, provenant de cette lumière rouge est modulé et sa longueur d'onde est fixée à 680 nm. Toutefois, contrairement au faisceau de mesure photoacoustique qui est constant à 35 Hz, le faisceau de fluorescence change de fréquence au cours de l'expérience.

Ainsi, le faisceau de fluorescence est d'abord modulé à 1.6 kHz. Cette faible fréquence nous permet de déterminer le niveau initial de fluorescence. Une fois que le faisceau de mesure photoacoustique arrive dans la cellule, cette lumière d'excitation augmente à 100 kHz. La fluorescence émise par l'échantillon est détectée par une diode de 710 nm.

Finalement, l'énergie qui émane de l'échantillon est captée sous forme d'ondes acoustiques par le microphone pour la désactivation non-radiative, et sous forme d'émission de fluorescence retournée au fluorimètre pour la désactivation radiative. Les signaux PA et de fluorescence ainsi générés sont transmis à un amplificateur à verrouillage de phases (EG & G / Princeton Applied Research, modèle 5210) par l'intermédiaire d'une photodiode permettant de produire une onde de référence. L'amplificateur à verrouillage de phase amplifie ces signaux PA et de fluorescence et analyse leurs composantes de phase et d'amplitude, puis les transmet sous formes de signaux électriques à un ordinateur qui permet d'avoir les tracés.

2. 3. 2. 2. Prise de mesure

Toutes les manipulations de la préparation des échantillons pour les mesures sont faites à la température de la pièce en présence de lumière verte. Pour chaque préparation, que ce soit les échantillons contrôles ou les échantillons traités, une solution contenant 250 µg de chlorophylle par ml de tampon de lavage respectif est préparée à partir des échantillons stockés au préalable à 2 mg de chlorophylle par ml du même tampon utilisé pour les mesures. Le tampon de lavage où sont stockés les thylacoïdes, et par la suite dilués, permet de les conserver sous forme de grana. Tous les échantillons, y compris ceux qui sont photoinhibés ne contiennent pas d'accepteur d'électron, ni aucun produit supplémentaire. Dans ces conditions, les échantillons conservent donc leur état natif et les valeurs d'émission de fluorescence et de chaleur sont obtenues en absence du quenching qui serait produit par les accepteurs qui par ailleurs court-circuiteraient la formation d'un gradient de pH. Lors de l'utilisation des inhibiteurs et découpleurs, ces agents sont ajoutés aux échantillons dilués comme je viens de mentionner et incubés selon le besoin de chaque produit.

Les échantillons sont gardés dans le noir à 4 °C durant toute l'expérience. A chaque mesure, 1 ml de la solution à 250 µg de chlorophylle par ml de tampon est homogénéisé puis filtré à travers un filtre de nitrocellulose de diamètre de pores approprié (0.8 µm pour les thylacoïdes et 0.45 µm pour les PSII et les PSII dépourvus de complexes de dégagement d'O₂). Par la suite un petit disque aux dimensions appropriées à la cellule est prélevé du centre du filtre à l'aide d'un poinçon, puis immédiatement introduit dans la cellule à l'aide du bras porte échantillon. Il est gardé dans le noir pendant 2 min avant toute expérimentation. Les mesures sont alors prises à la température de la pièce. Les paramètres de mesures sont choisis et déterminés soit manuellement, soit par ordinateur, selon les propriétés de l'échantillon et selon le genre d'expérience que l'on veut mener. Pour chacune des conditions expérimentales, les échantillons et les expériences ont été reproduites 5 fois avec 3 préparations différentes.

Pour plus de détails concernant ces paramètres, les différentes lumières utilisées dans toutes les expériences sont d'intensités et de durées différentes. La première lumière qui arrive dans la cellule est celle du fluorimètre PAM. elle est de très faible intensité, de 1.6 kHz et dure 3 s. Elle augmente à 100 kHz quand le faisceau de mesure PA arrive dans la cellule, et continue tout le long de la mesure, soit 128 s. Le faisceau de mesure PA est de 4.2 W m⁻², il est modulé à 35 Hz et dure tout le long de la mesure, soit aussi 128 s. Le troisième faisceau qui arrive sur l'échantillon est le faisceau saturant, il provient d'une lumière blanche de 180 Wm⁻², non modulée, et qui est émise sous forme de pulses périodiques.

Pour les mesures du quenching non-photochimique, 25 pulses d'une durée de 2 s chacun, excitent les échantillons qui ne servent que pour un seul cycle d'illumination. Ces pulses sont espacés par des périodes obscures de 3 s chacune. Ainsi la durée totale de l'illumination par le faisceau saturant est de 50 s. Pour les mesures du quenching photochimique, chaque échantillon est illuminé par une série de 10 pulses de 6 s chacun, dont on a considéré que le premier. La période précédant le premier pulse, ainsi que toutes les périodes obscures entre les pulses, était de 6 s. Cette durée nous a permis de déterminer avec exactitude le niveau initial de la fluorescence variable.

L'autre paramètre jugé très important est la constante du temps de l'amplificateur à verrouillage de phase. Cette constante de temps a été fixée à 30 ms pour toutes les mesures. Elle ne représente que 1.5 % et 0.3 % des durées respectives des pulses utilisés pour le quenching non-photochimique et le quenching photochimique. Le temps de réponse de l'appareil est donc très rapide vis à vis de l'ouverture et la fermeture du faisceau saturant. La constante de temps, étant ainsi très faible, nous permet de s'assurer de l'exactitude des valeurs obtenues pour les différents niveaux de saturation, que ce soit pour la fluorescence ou la photoacoustique.

Pour l'analyse des tracés obtenus, un programme informatique approprié a été mis au point et modifié selon les besoins des résultats désirés dans cette étude. Ce programme nous a permis de déterminer avec une grande précision, allant jusqu'à 1/1000, les valeurs simultanées des émissions thermiques et de fluorescence. Dans mon travail, je n'ai considéré que les trois premiers chiffres des valeurs des différents niveaux de fluorescence et de photoacoustique alors qu'ils ne présentent pratiquement pas de variation à ce niveau. Ainsi, les déviations standards, étant très faibles, n'ont pas été prises en considération lors de cette étude. De plus, je n'ai pas considéré d'abord ces variations minimales dans mes mesures pour la simple raison que je n'ai pas fait d'étude quantitative, mais mon but était surtout de montrer la grande variation qui existe entre les différentes conditions de mes expériences et ce d'une façon purement qualitative. La grande précision des résultats obtenus nous a permis, contrairement à nombreuses études précédentes, d'éviter l'utilisation des programmes de lissage de courbes afin d'éliminer l'effet du bruit absolument présent dans toute utilisation spectroscopique. Le programme était donc adapté à déterminer avec précision les niveaux de saturation des réactions photosynthétiques sur les tracés, sans tenir compte des pics dus au bruit que l'on observe surtout dans les tracés photoacoustiques. .

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3. 1. DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES DU "QUENCHING"

3. 1. 1. Les signaux photoacoustique et de fluorescence

Les tracés typiques des mesures simultanées du signal photoacoustique et du rendement de fluorescence sont présentés dans la figure 8.

La première augmentation observée dans le signal de fluorescence (fig. 8A) est induite par le faisceau d'excitation provenant du fluorimètre PAM (1.6 KHz). Le signal de fluorescence atteint un niveau initial appelé F_i . Ce dernier est utilisé comme une approximation de F_0 qui représente conventionnellement l'intensité de fluorescence non variable et qui est donc indépendante du transport photosynthétique des électrons. Dans les thylacoïdes des épinards, la différence entre les niveaux F_i et F_0 , vérifiée avec une lumière dans le rouge lointain, ne dépasse pas 2 % (Carpentier et al., 1991). Cette même lumière n'induit par contre aucun signal photoacoustique mesuré à 35 Hz (fig. 8B).

L'addition par la suite du faisceau de mesure photoacoustique modulé (35 Hz) et non saturant (4.2 Wm^{-2}) provoque une augmentation de la fluorescence à un niveau intermédiaire variable noté F_v . Ce niveau correspond à la réduction concomitante d'une portion des plastoquinones, accepteurs finaux des PSII. Simultanément, un niveau contrôle du signal photoacoustique, noté Q_c est obtenu. Ce niveau est équivalent au niveau F_v de la fluorescence (Carpentier et al., 1991).

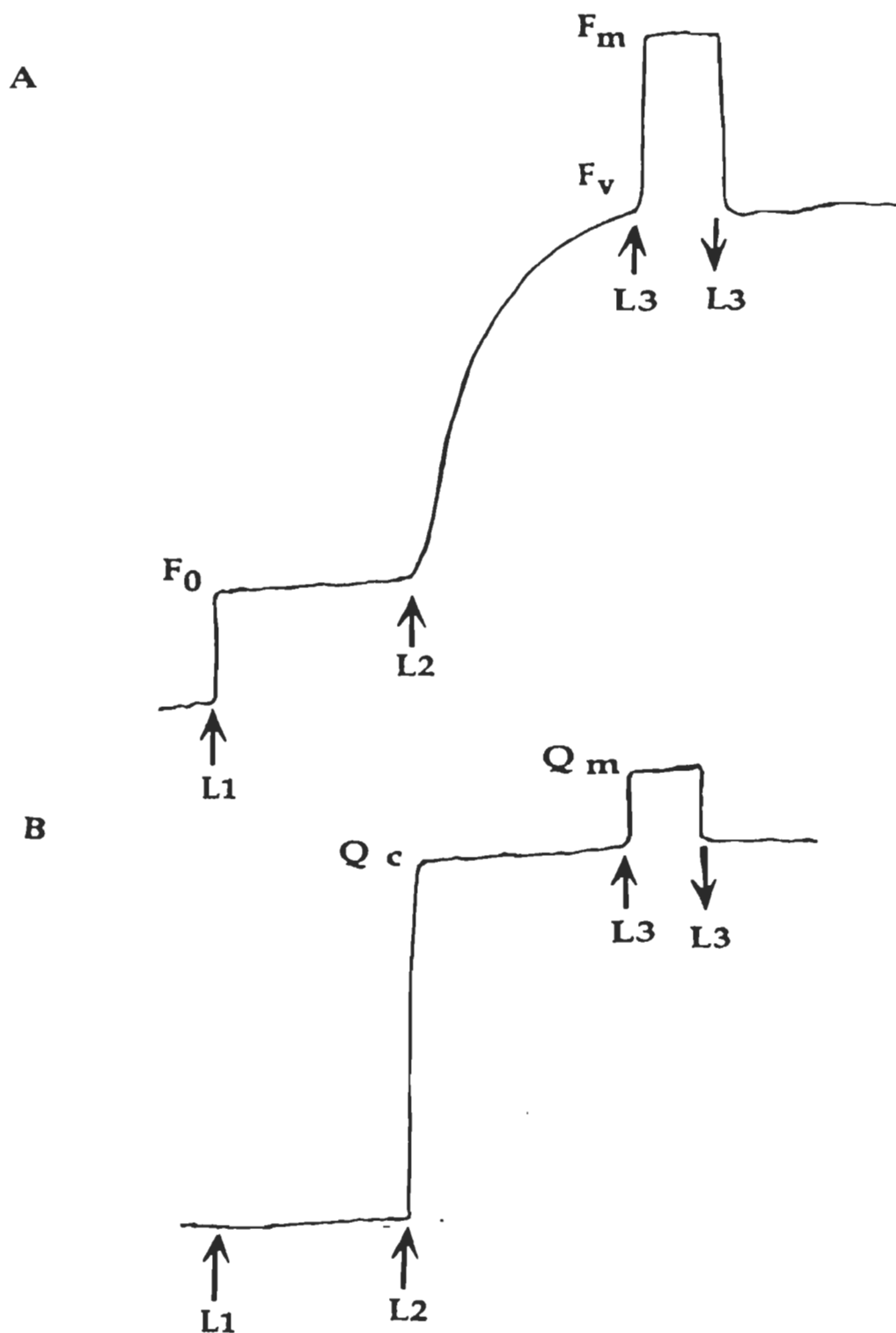


Figure 8 : Schéma des signaux (A) de Fluorescence, (B) Photoacoustique pris simultanément. \uparrow Ouverture et \downarrow Fermeture de la lumière. L_1 : Faisceau modulé de fluorescence. L_2 : Faisceau modulé de mesure photoacoustique (4.2 Wm^{-2} , 680 nm). L_3 : Faisceau saturant de lumière blanche (180 Wm^{-2}).

A l'application du faisceau saturant, qui est une lumière non modulée de 180 Wm^{-2} , les signaux de fluorescence et photoacoustique atteignent leurs valeurs maximales. Les niveaux obtenus sont désignés par F_m et Q_m , respectivement pour la fluorescence et la photoacoustique. ils sont interprétés comme la fermeture des centres réactionnels du PSII. Cette fermeture résulte de la réduction totale du bassin de plastoquinones et des accepteurs primaires Q_A . A ce niveau, il se produit une saturation simultanée du transport des électrons dans la membrane photosynthétique (Butler 1977). Toutefois, l'intensité du faisceau de mesure photoacoustique, qui induit le niveau intermédiaire de la fluorescence F_v , est suffisante pour fermer quelques centres réactionnels du PSII en réduisant une partie des plastoquinones (Genty et al, 1989). Le degré de réduction de ces plastoquinones peut être exprimé par l'équation du rendement photochimique du PSII:

$$\Phi_P = [(F_m - F_v) / F_m] \times 100 \quad (11)$$

où F_m et F_v représentent respectivement les niveaux maximal et variable de l'émission de fluorescence.

Du côté thermique, les différents niveaux du signal photoacoustique, qui sont d'ailleurs simultanés avec les niveaux de fluorescence, représente eux aussi le degré de réduction des plastoquinones qui s'exprime cette fois ci en termes d'emmagasinement de l'énergie (eq 4) (Carpentier et al., 1991).

$$\Phi'_r = [(Q_m - Q_c) / Q_m] \times 100 \quad (12)$$

Comme pour le cas de la fluorescence, Q_m représente le niveau maximal de l'émission thermique et Q_c , qui représente généralement le niveau stationnaire de la photosynthèse, exprime ici aussi le niveau variable de l'émission thermique et peut être noté Q_v (Carpentier et al., 1991).

3. 1. 2. Calcul des paramètres du "quenching"

Suite à l'illumination des échantillons préadaptés au noir, une période d'induction est nécessaire pour que la photosynthèse atteigne son état stationnaire. Durant cette période, la fluorescence de la chlorophylle est atténuée depuis son niveau maximal jusqu'à un niveau plus bas, dit "état stationnaire". Cette atténuation de la fluorescence a été décrite en deux types de processus, ou autrement dit, elle est divisée en deux composantes de nature, régulation et aspects différents (Briantais et al., 1986).

Le premier processus est l'atténuation de la fluorescence reliée à l'activité photochimique des membranes. Elle est contrôlée par l'état redox des accepteurs primaires des électrons, les quinones Q_A , avec Q_A oxydées comme quenchers naturels de la fluorescence (Shinkarev et Govindjee, 1993). Ce processus est défini comme "le quenching photochimique" et il est noté qp.

Le second processus d'atténuation de la fluorescence est relié à des mécanismes qui ne sont pas de nature photochimique. Cette atténuation est dite non-photochimique, et elle est notée q_N . Elle est due, comme c'est indiqué dans la section 1.3, à trois causes principales: la formation du gradient transmembranaire des protons, les états de transition des CCLII et la photoinhibition. Le plus communément étudié de ces mécanismes est le quenching relié à l'énergisation de la membrane du thylacoïde. Il est défini comme "le quenching non-photochimique énergie-dépendant", et il est noté q_E (Briantais et al., 1979). Dans le cadre de notre travail, pour l'étude du quenching non-photochimique, nous allons surtout nous baser sur le traitement de ce dernier.

Conventionnellement, pour l'étude du quenching, on utilise une succession de courts flashes répétitifs de lumière intense. Cette méthodologie nous permet de saturer momentanément les réactions photochimiques, et donc d'éliminer la composante du quenching photochimique de la fluorescence modulée du signal total. Toute atténuation restante ne provient alors que des mécanismes non-photochimiques. Ainsi, on peut quantifier, de façon plus exacte, les coefficients de l'atténuation photochimique et non-photochimique de la fluorescence.

La figure 9 montre le signal de la fluorescence modulée émis par les thylacoïdes. Avant de prendre les mesures, chaque échantillon est pré-adapté au noir pendant 2 min. Cette précaution nous permet de s'assurer de la relaxation de toutes les quinones réduites, et par conséquent l'ouverture de tous les centres réactionnels du PSII.

L'échantillon est illuminé d'abord par une lumière modulée de très faible intensité qui nous permet de déterminer le niveau F_0 décrit dans la section précédente. L'échantillon est par la suite exposé à la lumière du faisceau photoacoustique qui permet d'atteindre le niveau d'état stationnaire de la photosynthèse. La série de pulses actiniques intenses et non modulés sature périodiquement la photosynthèse. A chacun de ces pulses, l'état stationnaire de la fluorescence augmente jusqu'à la saturation de l'émission de la fluorescence. Un niveau F_s est alors obtenu pour chaque pulse. On remarque que ces niveaux F_s décroissent en fonction des nombres de pulses, c'est à dire, en fonction du temps de l'illumination. Cette chute entre le premier niveau de saturation, désigné ici F_m , et les niveaux suivants, F_s , est due à l'atténuation non-photochimique de la fluorescence vu que le faisceau pulsé sature à chaque fois les réactions photochimiques.

Tenant compte de la durée de l'illumination totale des échantillons, qui est de 50 sec, la seule composante qui participe à la formation de ce quenching non-photochimique est induite par la formation du gradient transmembranaire de protons (Noctor et Horton, 1990). Ce quenching est désigné donc par "quenching énergie-dépendant".

$$qE = [(F_m - F_s) / (F_m - F_0)] \times 100 \quad (13)$$

Toutefois, à chaque fois que le faisceau de lumière saturant est éteint, l'activité photochimique est restaurée. Ce recouvrement d'activité est traduit par la relaxation de la fluorescence de F_s à F_v . Ainsi l'atténuation photochimique de la fluorescence peut être exprimée par la même équation que ϕ_p (eq 11) mais avec une correction au niveau de F_0 :

$$qP = [(F_m - F_v) / (F_m - F_0)] \times 100 \quad (14)$$

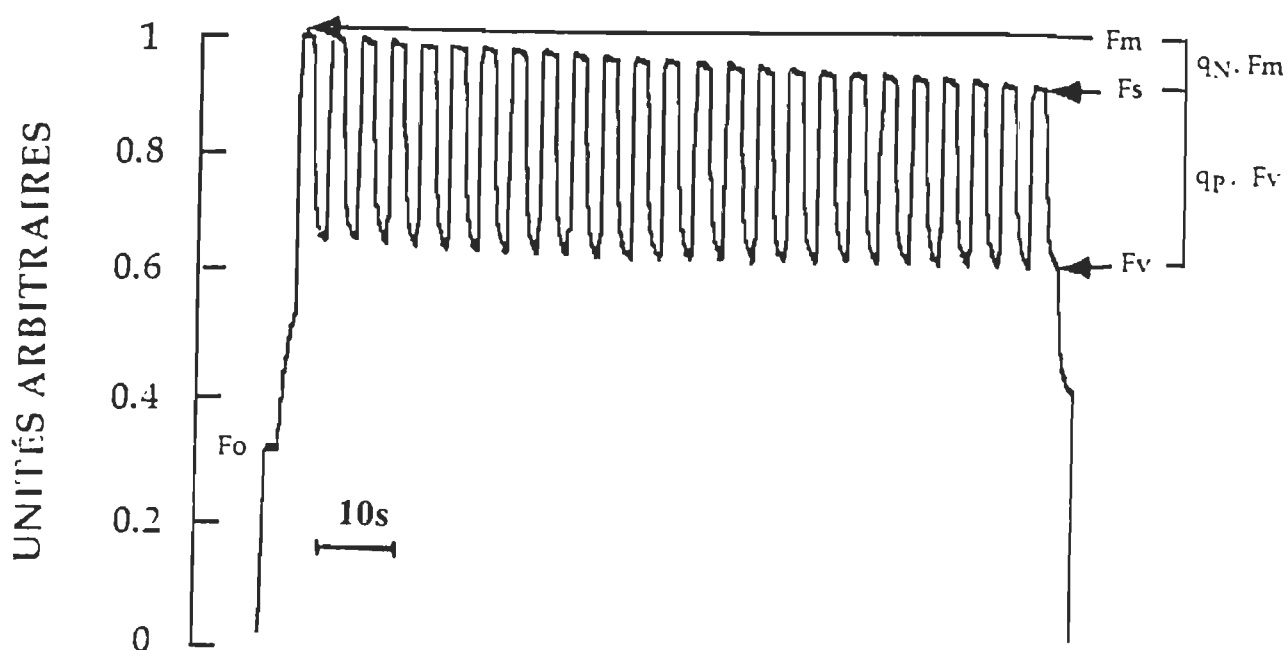


Figure 9 : Tracé représentatif de l'émission de la fluorescence dans les membranes thylacoïdiennes. 25 pulses de lumières saturante sont appliqués pour générer un quenching non photochimique et photochimique de l'émission de fluorescence. F_m : niveau maximal. F_s : niveau saturant. F_v : niveau variable. F_o : niveau initial. q_N : quenching non-photochimique. q_P : quenching photochimique. Les valeurs qui représentent les niveaux de fluorescence sont des unités arbitraires normalisées 1. Les pulses sont d'une durée de 2 s et sont espacés par des périodes obscures de 3s chacune.

Dans les travaux de Genty et al. (1989), il a été montré que le quenching photochimique est parfaitement corrélé au rendement quantique du transport des électrons. Cette corrélation a été mise en évidence par la relation linéaire qui existe entre les deux paramètres. Ces auteurs ont montré que le transport des électrons, et par corrélation le quenching photochimique, ne dépend que de la quantité des centres réactionnels des PSII ouverts et de l'efficacité avec laquelle ces centres captent et utilisent l'énergie d'excitation, sans avoir à prendre F_0 en compte. Dans ce cas, on se permet d'exprimer l'équation du quenching photochimique (eq 14) par :

$$qp' = [(F_m - F_v) / F_m] \times 100 \quad (15)$$

Dans le but de vérifier d'avantage la validité de notre raisonnement concernant la possibilité d'éliminer F_0 des équations du quenching, nous avons apporté une méthode directe qui vise à comparer le paramètre du quenching calculé en considérant F_0 comme référence de base et le paramètre calculé en tenant compte de la totalité du signal. Les différentes valeurs ont été apportées en fonction du nombre de pulses appliqués aux échantillons.

La figure 10 montre les courbes représentatives des valeurs du quenching photochimique, en fonction du nombre des pulses. Ces pulses sont de courte durée, 2 secondes, et sont espacées par des périodes d'obscurité de 3 secondes chacune. Cette alternative nous permet de réaliser des périodes de saturation et de désaturation du transport d'électrons et de déterminer à chaque 5 secondes une nouvelle valeur de F_s , ce qui peut définir une méthode de mesurer cinétiquement l'atténuation de la fluorescence.

La figure 10A représente les cinétiques de l'atténuation de la fluorescence, calculées d'après les deux équations du quenching photochimique cités précédemment qp (eq 14) et qp' (eq 15). La courbe F est calculée en considérant la valeur de F_0 comme origine du signal. Dans ce cas, une correction du paramètre du quenching photochimique a été apportée en ajustant les différents niveaux à F_0 .

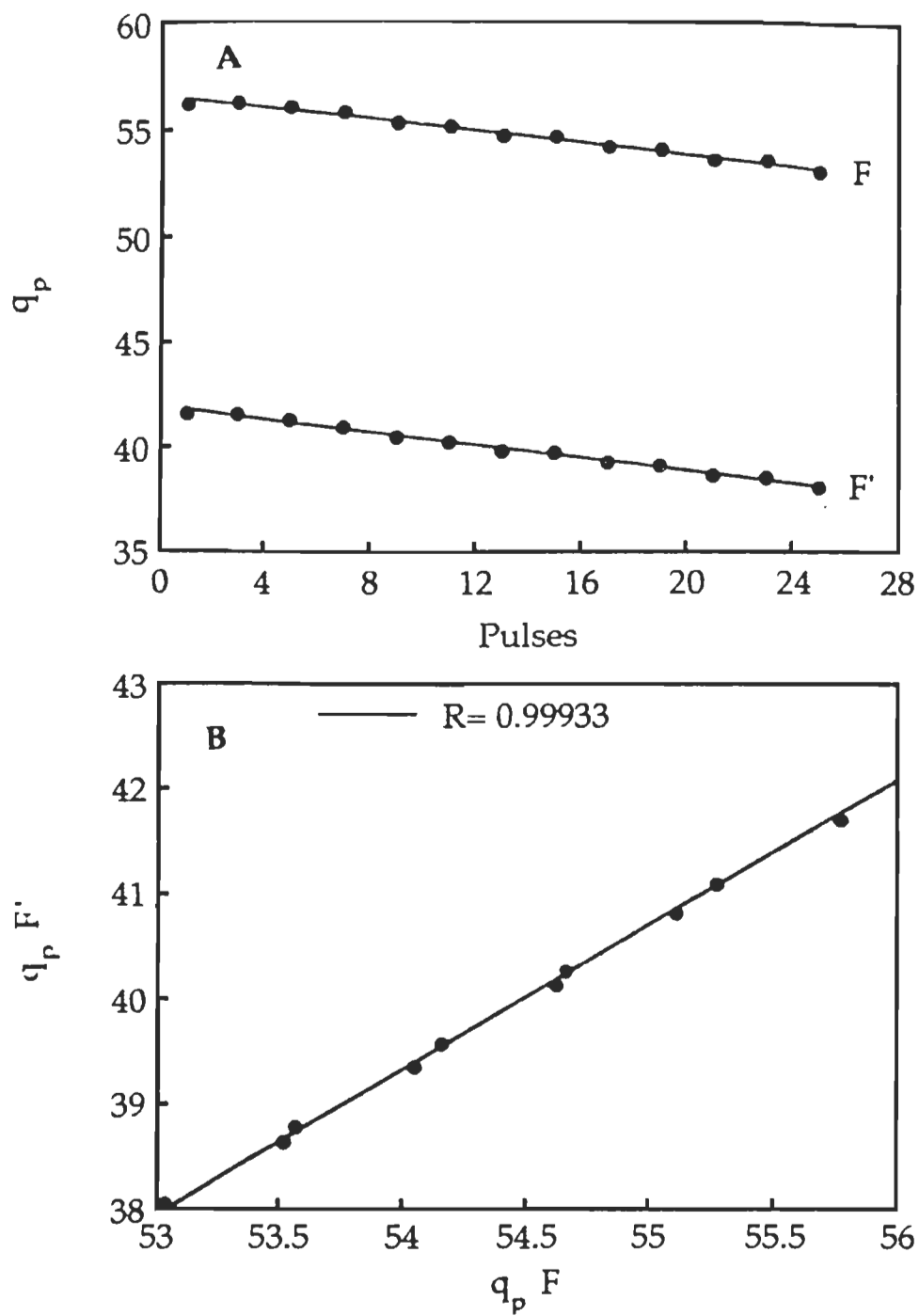


Figure 10 : (A) Courbes représentatives des quenchings photochimiques de la fluorescence dans les membranes thylacoïdiennes en fonction du nombre de pulses. (F) en tenant compte de F_0 , (F') sans tenir compte de F_0 . Toutes les valeurs représentent la moyenne de 5 mesures différentes. (B) courbe de corrélation entre $q_p F$ et $q_p F'$. Le coefficient de corrélation est de 0.99933.

Le calcul ne prend alors en considération que la fluorescence variable et le quenching photochimique qp (eq 14) s'exprime comme:

$$qpF = [(F_S - F_V) / (F_S - F_0)] \times 100 \quad (16)$$

La courbe F' est calculée en incluant le niveau F_0 dans le signal de fluorescence. L'équation du quenching photochimique qp' (eq 15) engendre tout le signal de fluorescence et s'exprime comme :

$$qpF' = [(F_S - F_V) / F_S] \times 100 \quad (17)$$

En analysant le graphe dans la figure 10A, nous remarquons que les deux courbes F et F' présentent la même évolution cinétique et peuvent donc être parfaitement corrélées.

Le tracé dans la figure 10B illustre clairement qu'il existe un très bon accord entre les valeurs du quenching photochimique ajustées à F_0 , qpF (eq 16) et celles incluant tout le signal de fluorescence, qpF' (eq 17). En effet, le rapport entre les deux méthodologies de calcul est parfaitement linéaire. Ce résultat montre que la différence entre qpF et qpF' est purement quantitative, et que l'utilisation de qpF' comme paramètre de quenching n'affecte pas la qualité des raisonnements.

Par une approche similaire, on peut avoir le même type de corrélation entre les paramètres des quenchings non-photochimiques obtenus selon qu'on considère F_0 ou non. Ainsi, nous avons à corréliser entre qE (eq 13), que l'on va noter désormais qNF , et un nouveau paramètre du même quenching s'exprimant selon l'équation suivante:

$$qNF' = [(F_m - F_s) / F_m] \times 100 \quad (18)$$

C'est un paramètre simplifié, comme pour le quenching photochimique, et il est en fonction de qNF . De son côté, cette équation du quenching ne présente, elle aussi, qu'une différence quantitative par rapport à l'équation de qNF . La figure 11 montre que la relation qui existe entre ces deux nouveaux paramètres, qNF et qNF' est linéaire, et que l'on peut donc utiliser sans réserve qNF' pour le calcul du quenching non-photochimique énergie-dépendant.

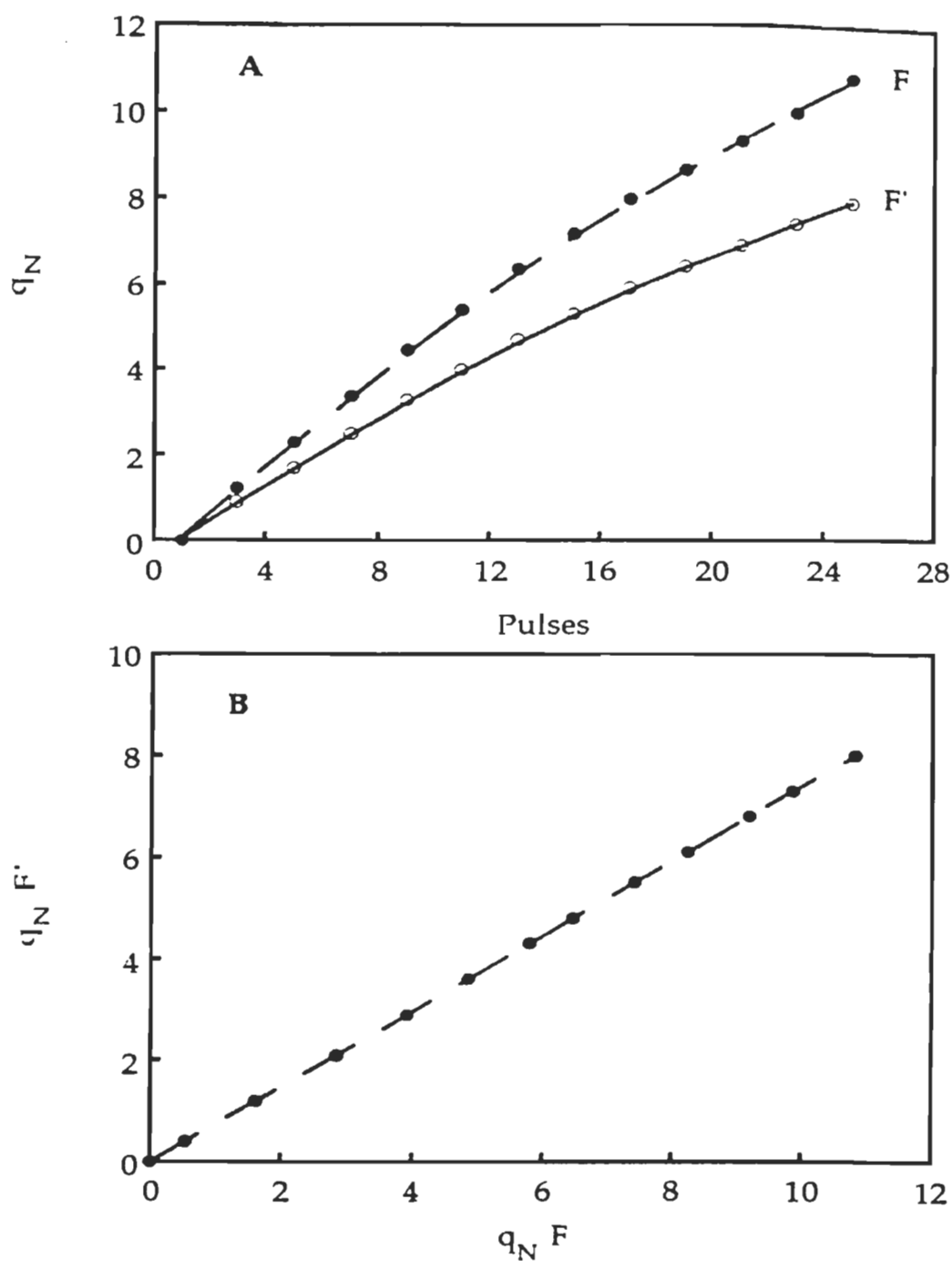


Figure 11 : (A) Courbes représentatives des quenchings non-photochimiques de la fluorescence dans les membranes thylacoïdiennes en fonction du nombre de pulses. (F) en tenant compte de F_0 , (F') sans tenir compte de F_0 . Les valeurs sont une moyenn de 5 mesures. (B) courbe de corrélation entre $q_N F$ et $q_N F'$.

Ainsi, comme nous nous intéressons en premier lieu à l'étude du signal photoacoustique, il était primordial de déterminer les paramètres qpF' (eq 17) et q_NF' (eq 18) qui permettent de négliger la valeur de F_0 plus difficile à déterminer dans le tracé thermique, et qui s'avère inutile dans cette étude.

En se basant donc sur ces paramètres du quenching de fluorescence ainsi déterminés, nous allons apporter une étude détaillée qui vise à illustrer l'étendue réelle de la régulation de l'émission thermique indiquée conventionnellement par les quenchant de fluorescence. Cette étude est rendue fiable grâce à l'utilisation d'un appareil permettant d'obtenir simultanément les tracés d'émission thermique, obtenus par spectroscopie photoacoustique, et les tracés d'émission de fluorescence, obtenus par spectroscopie de fluorescence.

Notre étude sera donc présentée, comme indiqué dans les objectifs, en deux volets distincts qui vont traiter des variations simultanées des tracés d'émission photoacoustique et de fluorescence. Les deux parties porteront sur les études spécifiques des quenching non photochimiques et photochimiques, séparément.

Le premier volet présenté dans cette étude portera sur l'analyse comparative des variations non photochimiques des tracés d'émission photoacoustique et de fluorescence, par l'utilisation de différents facteurs affectant le quenching non photochimique, à savoir les découpleurs et les inhibiteurs, l'étude de la participation du cycle des xanthophylles dans la régulation du quenching non photochimique de fluorescence et son action sur le dégagement thermique, ainsi que l'effet d'un agent ADRY.

Dans le deuxième volet, nous allons inspecter, toujours par étude comparative de ces deux spectroscopies, photoacoustique et de fluorescence, l'effet de la photoinhibition sur les émissions thermique et de fluorescence. le but de cette étude va être surtout porté sur la détermination de l'origine du signal photoacoustique qui persiste dans les échantillons photoinhibés. Ce type d'expérimentations va être réalisé sur des thylacoïdes, des membranes enrichies en particules des PSII et sur des préparations spéciales de PSII dépourvus de complexes de dégagement d'oxygène et de Mn.

3. 2. RÉGULATION NON-PHOTOCHIMIQUE DE L'ÉMISSION THERMIQUE

Dans les conditions de faible luminosité, le rendement quantique à l'état stationnaire du dégagement d'oxygène (défini en moles d'O₂ dégagées par mole de photons absorbée) est très élevé. La photosynthèse est alors principalement limitée par la densité du flux photonique (PFD). L'augmentation des valeurs de la PFD provoque un déclin du rendement quantique du dégagement d'oxygène. La photosynthèse devient donc progressivement saturée par la lumière, c'est à dire, il y a plus de lumière absorbée que de lumière utilisée pour les réactions photosynthétiques (Heber et al., 1986).

L'excitation excessive de l'appareil d'absorption de la lumière, à savoir la chlorophylle, conduit potentiellement à des réactions destructives des deux photosystèmes. Cependant, le photosystème II, étant le plus touché des deux photosystèmes, adopte différents moyens de protection et d'adaptation pour parer les effets destructeurs de ce phénomène.

Chez les plantes supérieures, la dissipation de cet excès de lumière peut se faire par émission radiative, et c'est le cas de la fluorescence, ou par émission non-radiative sous forme de chaleur. Cette dernière, qui est une désexcitation non-destructive des pigments, est généralement prise pour le meilleur moyen de protection des plantes contre les endommagements possibles de l'appareil photosynthétique. Ces dommages sont causés par la saturation de la capacité des plantes à utiliser la lumière pour des fins photosynthétiques (Baker 1991). L'énergie est préférentiellement dissipée sous forme de chaleur et peut être indiquée par le quenching non-photochimique de la fluorescence de la chlorophylle (Schreiber et al., 1986).

Les travaux accomplis par Krause et al. (1988) et Buschmann et Kocsanyi (1989) ont apporté une grande contribution à la résolution de l'émission thermique et sa relation avec le quenching non-photochimique de fluorescence. Ces travaux ont été réalisés grâce à l'amélioration des techniques de la spectroscopie photoacoustique et à l'utilisation simultanée du spectrofluorimètre PAM.

Ces auteurs ont confirmé que la régulation de la dissipation thermique de l'énergie lumineuse absorbée dans les chloroplastes peut être évaluée par le quenching énergie-dépendant de la fluorescence. Cependant, aucune étude sérieuse de la proportionnalité directe qui existe entre ces deux paramètres n'a été reportée dans la littérature. Le manque de précision dans les tracés présentés et la difficulté de la détermination des paramètres des échantillons, comme dans le cas des feuilles, a été le majeur obstacle pour de telles corrélations.

On sait que les techniques actuelles de mesure de la fluorescence permettent de séparer q_p de q_N . Ainsi, en utilisant la technique de fluorescence en comparaison avec les signaux de l'émission thermiques mesurés simultanément par spectroscopie photoacoustique, nous pouvons déterminer sur un même échantillon, les variations affectant les deux tracés photoacoustique et de fluorescence, pour un état énergisé donné et par conséquent, l'évaluation directe de la régulation thermique.

3. 2. 1. Variation non photochimique de l'émission thermique.

Les tracés d'émission de la fluorescence et de la photoacoustique, mesurés simultanément sont présentés dans la figure 12. Dans le tracé d'émission de la fluorescence Fig. 12 A, à chaque pulse, un niveau F_s est obtenu suite à une forte illumination par le faisceau non-modulé. Ce traitement a été suffisant pour induire un quenching non-photochimique, principalement énergie-dépendant. Le tracé de l'émission thermique présenté dans la fig. 12 B, pris simultanément avec le tracé de fluorescence, montre par contre une augmentation des valeurs des différents Q_s obtenus par les mêmes pulses.

Afin de pouvoir mesurer la variation observée dans le tracé photoacoustique, nous avons introduit un nouveau paramètre de mesure. Ce paramètre est homologue à l'équation du calcul du quenching non photochimique de la fluorescence, et tient compte uniquement des niveaux de saturation de la photosynthèse. Il est donc différent du rendement du stockage de l'énergie photochimique qui considère, lui, aussi bien les niveaux maximum que les niveaux de l'état stationnaire de la photosynthèse.

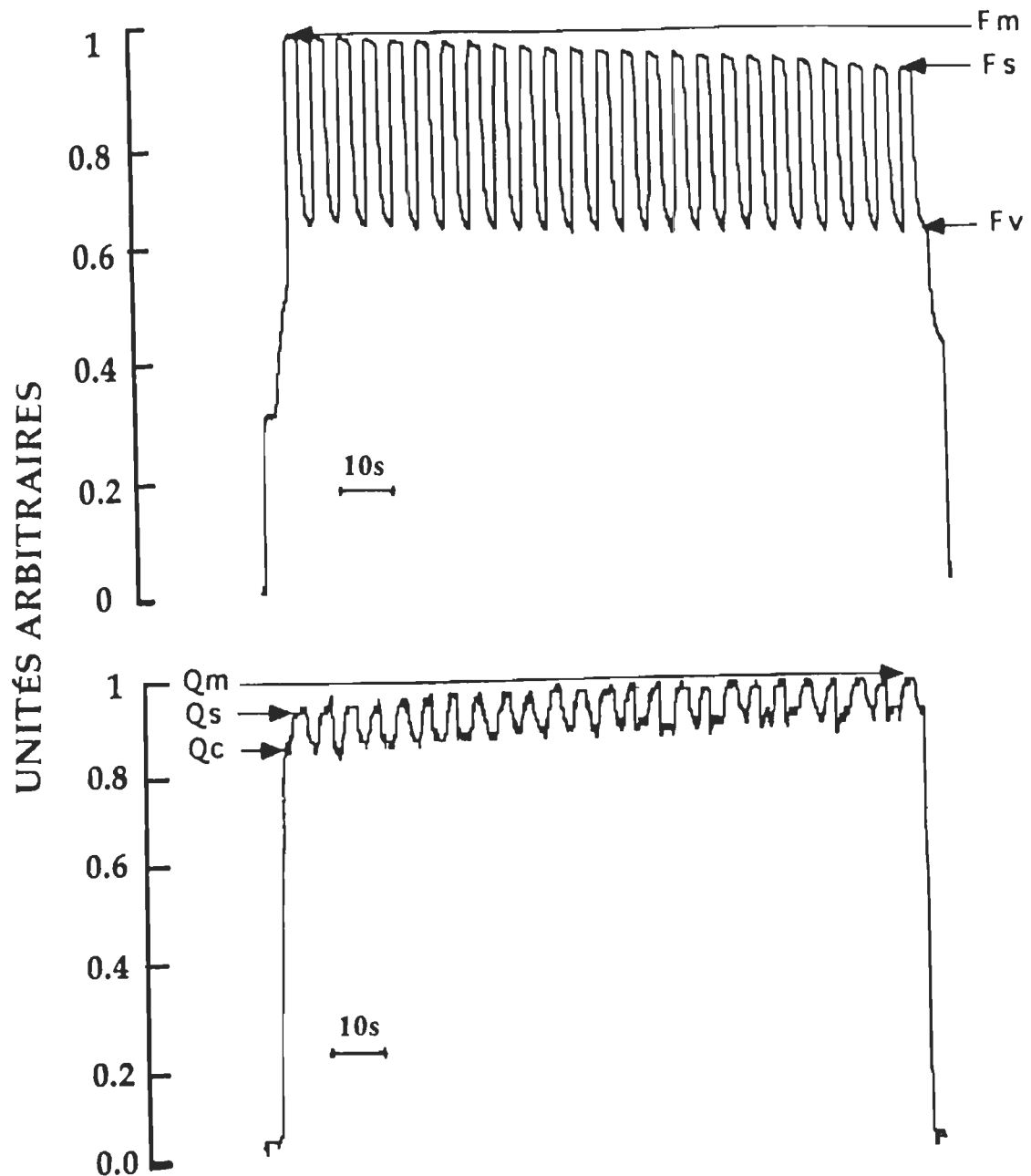


Figure 12: Tracés représentatifs des émissions simultanées de fluorescence et photoacoustique dans les membranes thylacoïdiennes. 25 pulses de 2 s chacun sont appliqués périodiquement à l'échantillon dans la cellule PA. Le temps d'illumination saturante totale est de 50 s. La durée de l'expérience est de 128 s. (En haut) Emission de fluorescence: F_m représente le niveau maximal, F_s le niveau saturant et F_v le niveau variable. (En bas) Emission thermique: Q_m représente le niveau maximal, Q_s le niveau saturant et Q_c le niveau variable. La constante de temps de l'appareil est de 30 ms. Les émissions sont normalisées et représentées en unités arbitraires.

Pour une meilleure corrélation avec l'équation du quenching non photochimique de fluorescence (eq 18), ce paramètre de la variation de l'émission thermique va être représenté comme la différence entre le niveau maximal, Q_m , et les différents niveaux saturants, Q_s . Toutefois, comme ce paramètre reflète le degré de l'augmentation de l'émission thermique, le niveau Q_m , contrairement à F_m , sera représenté par le niveau de saturation du dernier pulse considéré. Ainsi, plus on progresse dans le temps, plus la valeur de paramètre est petite. Cette atténuation, ainsi calculée, pourra représenter une cinétique comparable à l'augmentation du quenching non photochimique de la fluorescence, mais qui est de sens inverse. Autrement dit, la valeur de l'équation du quenching non photochimique de fluorescence est d'autant plus grande que celle indiquée par l'équation photoacoustique est petite, tout en reflétant le degré de l'augmentation de l'émission de chaleur.

Partant du fait que les valeurs, obtenues par le paramètre du calcul de la variation des niveaux saturants du tracé de l'émission thermique, sont décroissantes en fonction du temps de l'illumination, nous nous permettons de donner à ce nouveau paramètre le nom du "quenching non photochimique de l'émission thermique". On va le noter pour la suite de notre discussion, $q_{NQ'}$, et va être représenté par l'équation suivante:

$$q_{NQ'} = [(Q_m - Q_s) / Q_m] \times 100 \quad (19)$$

Pour une meilleure analyse des résultats obtenus dans cette étude, nous avons opté, en se basant sur la parfaite corrélation entre les équations du quenching photochimique de fluorescence $q_{PF'}$ (eq 17) et le rendement de l'emménagement de l'énergie Φ'_r (eq 12), de représenter ce dernier comme la composante de l'atténuation photochimique de l'émission thermique. Il sera donc formulé ainsi:

$$q_{PQ'} = [(Q_s - Q_v) / Q_s] \times 100 \quad (20)$$

Contrairement au $q_{NQ'}$ (eq 19), ce quenching photochimique, $q_{PQ'}$ (eq 20) représente directement le degré d'atténuation thermique, exactement de la même façon que l'émission de fluorescence.

3. 2. 2. Analyse du quenching non photochimique thermique

Le mécanisme principal du quenching non photochimique de fluorescence dépend de l'acidification du lumen du thylacoïde (Briantais et al., 1979). Cette acidification résulte de la translocation photo-induite des protons à travers la membrane du thylacoïde. Le quenching qui en résulte est appelé quenching énergie-dépendant, q_E . Il est généralement admis que ce quenching se traduit par une augmentation de la désactivation thermique de la chlorophylle excitée (Krause et al., 1988).

La figure 13 montre les deux courbes du quenching non photochimique énergie-dépendant de la désexcitation thermique et de fluorescence, calculées en fonction des pulses. Les mesures ont été prises sur des échantillons de thylacoïdes isolés introduits dans la cellule photoacoustique sans aucun traitement spécial et sans accepteur d'électrons.

On remarque, d'après les courbes de mesures, qu'une diminution progressive de $q_N Q'$ de 1.4 % à 0 % (graphe du bas) se produit en parallèle avec l'augmentation de $q_N F'$ de 0 % à 7.9 %. Ces deux variations, étant concomitantes, doivent sûrement avoir la même origine. L'interprétation la plus probable est que l'augmentation de l'émission thermique se traduit par la diminution de l'émission de la fluorescence.

A première vue, en comparant les valeurs maximales des quenchings de la fluorescence et thermique, il semble que le quenching de fluorescence représente environ 6 fois celui de la photoacoustique. Cependant, une analyse plus profonde de ces mêmes résultats montre que cette proportionnalité n'est qu'apparente, et que les vraies valeurs des quenchings dépendent des pourcentages de chacune de ces deux émissions par rapport à l'énergie totale émise. Il est généralement connu que lors de la saturation de tous les centres réactionnels des photosystèmes par une lumière très forte, l'émission de fluorescence n'excède pas dans les meilleurs des cas les 3 % de l'énergie absorbée (Barber et al., 1991). Le reste de l'énergie qui ne peut être utilisé pour les réactions photochimiques, et qui approche les 97 % (Björkman et Demming, 1987), est dégagé sous forme de chaleur grâce à la désactivation thermique.

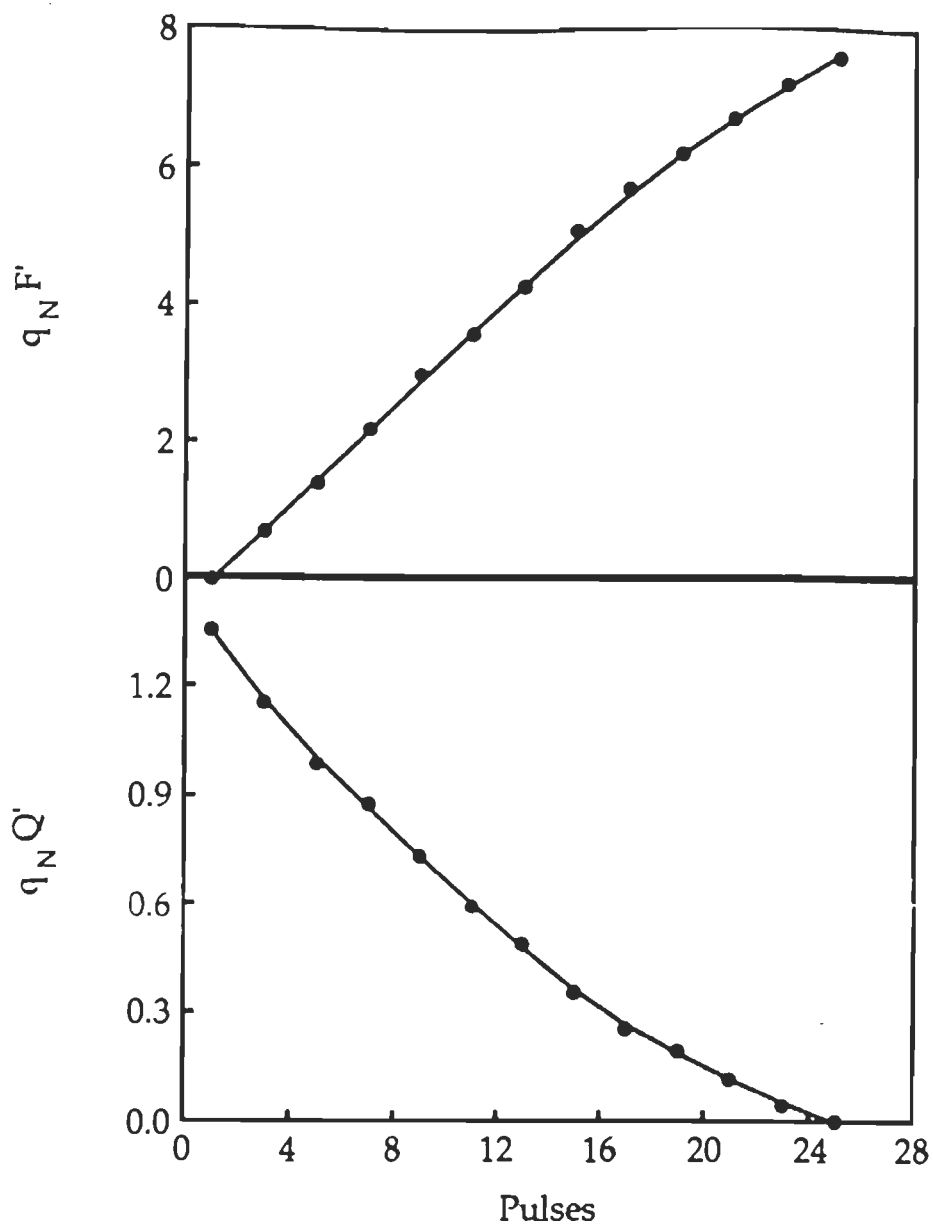


Figure 13 : Courbes représentatives des quenchings non photochimiques en pourcentages des émissions de fluorescence (figure du haut) et thermique (figure du bas) chez les thylacoïdes, en fonction du nombre de pulses. Un pulse représente 2 s d'illumination saturante suivi de 3 s d'obscurité. Les valeurs de $q_{NF'}$ et $q_{NQ'}$ sont présentées en pourcentages respectifs des signaux de fluorescence et thermique.

Si nous analysons maintenant les valeurs des quenchings thermique et de fluorescence représentées dans la figure 13, nous verrons que 7.9 % de l'émission de fluorescence totale, et qui est de 3 %, ne représente en réalité que 0.24% de l'énergie émise totale, ce qui est une valeur extrêmement faible. Par le même raisonnement, 1.28 % de l'émission de chaleur totale, et qui est de 97%, représente une variation 1.24% de l'énergie émise totale, c'est une valeur très élevée par rapport à celle de la fluorescence. D'après ces nouvelles valeurs, nous pouvons comparer plus exactement les quenchings de fluorescence et thermique. En fait, ces valeurs indiquent que le quenching thermique est 5 fois plus élevé que le quenching de fluorescence. Cette nouvelle proportionnalité suggère que la relation qui existe entre l'émission de chaleur et l'émission de fluorescence n'est pas aussi simple qu'il est spéculé dans les travaux antérieurs.

Quenching	Par rapport à l'émission totale	Par rapport à l'énergie totale
Fluorescence	7.9 %	0.24 %
Thermique	1.28 %	1.24 %

Tableau 2 : Quenchings thermique et de fluorescence par rapport à leurs émissions respectives et à l'énergie totale.

Pour tenter d'expliquer ce phénomène tout à fait inattendu, l'hypothèse la plus probable est l'implication des complexes collecteur de lumière dans la régulation de l'émission thermique lors de la désexcitation de la chlorophylle. l'analyse plus profonde des relations structure-fonction de ces complexes, qui sont très susceptibles de répondre aux variations de pH luminal, représente la clé de l'interprétation de ce phénomène.

En effet, d'après une étude récente menée par Ruban et ses collaborateurs (1992), la quantité de chaleur dégagée suite au quenching de fluorescence provient en totalité du complexe collecteur de lumière. Ces auteurs ont montré que la formation de q_E est accompagnée par des variations dans les spectres d'absorption des CCLII suite à changements conformationnels probablement provoqués par la protonation de l'espace luminal du thylacoïde (Gilmore et Yamamoto, 1992). Par la suite, Mulineaux en 1993 a analysé plus en détail ces changements conformationnels, et il les a attribués à l'agrégation des CCLII. Il a aussi démontré dans son étude que cette agrégation résulte en un quenching de fluorescence qui est accompagné par une augmentation de l'émission de chaleur.

Toujours d'après ses résultats, Mulineaux en se basant sur des pourcentages des émissions thermique et de fluorescence, et qui sont respectivement de 70% et 3%, a pu démontré que près de 75% de la fluorescence sont quenchés suite à l'illumination, alors que l'augmentation de chaleur ne représente pas plus de 26% de l'émission thermique totale. Ces résultats confirment le consensus général qui postule que la variation thermique est beaucoup plus faible que celle de la fluorescence. Toutefois, si l'on exprime ces mêmes valeurs comme des pourcentages par rapport à l'énergie totale absorbée, nous verrons que les 75 % quenchés de l'émission de fluorescence n'en représentent en fait que 0.6%, alors l'augmentation de chaleur, et qui est de 26%, atteint elle 1.8% de l'énergie totale absorbée. Dans ce cas, où les échantillons ne contiennent que des CCLII isolés, il est aussi important de noter le facteur de 3 entre l'émission thermique et l'émission de fluorescence. Ce résultat nous permet d'écarter toute possibilité de participation d'éléments des centres réactionnels autres que les complexes collecteurs de lumière.

Revenons à nos résultats, même si l'on considère que l'émission thermique ne provient que des complexes collecteurs de lumière et qui représente 3 fois celle de fluorescence (d'après Mulineaux), il reste à expliquer une bonne partie de cette émission thermique et qui représente 2 fois la valeur du quenching de fluorescence, c'est à dire près de 0.5% de l'énergie totale absorbée. Toutefois, cette différence n'est pas difficile à accepter si l'on considère les types d'échantillons qui ont été utilisés dans chacune des deux études.

En effet, dans le cas de Mulineaux, les préparations qui ont servi de matériel d'étude contiennent uniquement des CCLII isolés. Si nous comparons les résultats qu'il a trouvés par rapport aux nôtres, nous verrons que c'est du côté de la fluorescence qu'il y a la plus grande divergence. la valeur qu'il a trouvée pour le quenching non photochimique représente 2.5 fois celle que nous avons obtenue par l'utilisation des thylacoïdes intacts. Du côté thermique, il ne semble pas avoir une énorme différence entre les deux valeurs du quenching qui sont de 1.8 % et 1.4 % respectivement pour les CCLII et les thylacoïdes. L'explication de la différence ainsi observée entre les deux préparations réside dans le fait que les CCLII isolés sont moins protégés des effets de la protonation du milieu environnant provoquée par l'illumination, et sont donc plus susceptibles à l'agrégation que les CCLII encrê dans la membrane thylacoïdienne. Cette agrégation se reflète donc sur leur émission de fluorescence plus que sur l'émission de chaleur qui proviendrait de la dissociation de leurs unités en monomères, cette hypothèse sera davantage confirmée dans la suite de notre étude.

Finalement, afin de mieux caractériser la corrélation négative qui existe entre les deux paramètres du quenching non photochimique en fonction du temps, nous avons vérifié la relation qui lie les deux cinétiques en représentant chaque valeur de $q_N Q'$ en fonction de la valeur de $q_N F'$ prise au même pulse. Le tracé obtenu, et qui est présenté dans la figure 14, présente un coefficient de corrélation de 0.996, ce qui montre que cette relation, à n'importe quel moment du temps d'illumination, est parfaitement linéaire. D'après ce résultat, nous pouvons conclure qu'en général, le quenching de fluorescence est accompagné par une émission thermique 5 fois plus importante.

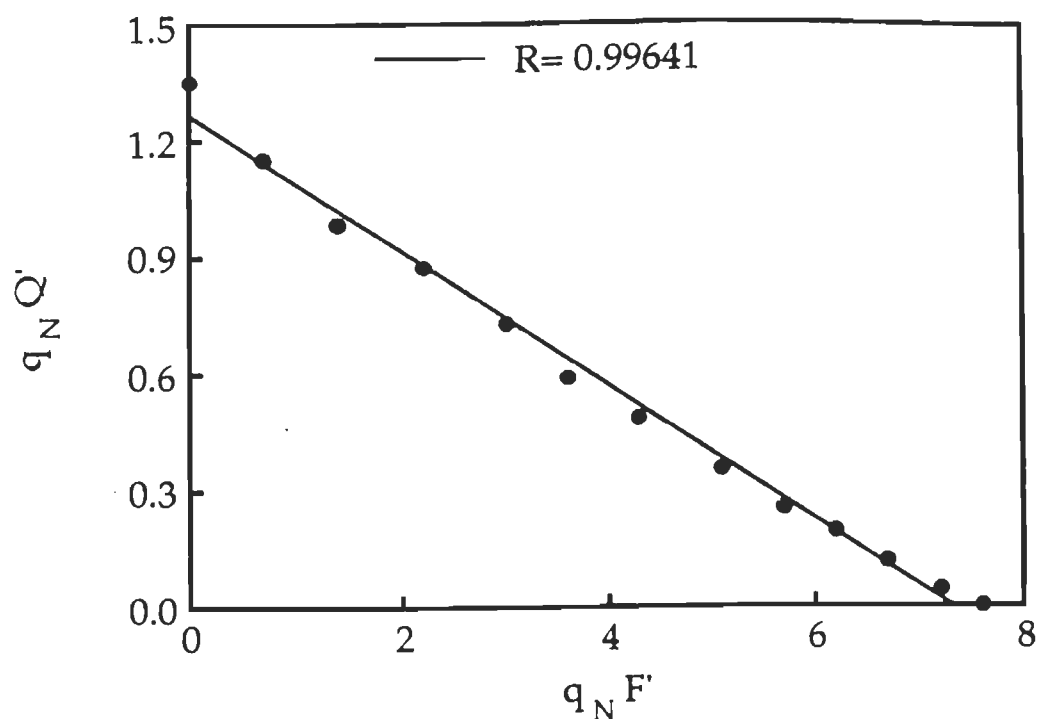


Figure 14 : Courbe de corrélation entre le quenching non-photochimique de fluorescence $q_N F'$ et le quenching non-photochimique thermique $q_N Q'$ dans les membranes thylacoïdiennes. Les valeurs des deux quenchings sont en pourcentages des signaux de fluorescence pour $q_N F'$ et photoacoustique pour $q_N Q'$. Le coefficient de corrélation R est de 0.99641.

Ce simple résultat, qui pourrait paraître pourtant très évident, constitue la seule preuve, jusqu'à présent fournie, de la relation réelle qui existe entre l'augmentation du quenching énergie-dépendant de l'émission de fluorescence et l'augmentation de l'émission thermique. L'originalité de cette information réside dans deux points principaux; la précision avec laquelle sont déterminées les valeurs des deux quenching photoacoustique et de fluorescence, et la reproductivité des tracés d'émission. D'ailleurs, toutes les valeurs qui sont reportées dans ce travail ont été vérifiées par 5 mesures différentes.

La reproductivité des tracés de mesures est rendue possible grâce à un contrôle minutieux de tous les paramètres de l'échantillon. Tout particulièrement, l'utilisation des thylacoïdes isolés est d'un intérêt primordial dans les mesures photoacoustiques. La détermination des caractéristiques chimiques des tampons d'une part, et la concentration de la chlorophylle d'autres part, permet de recréer, pour chacune des mesures, les mêmes conditions de base, comme elle permet de mieux contrôler les variations qui peuvent être apportées à ces conditions.

Dans le but de s'assurer que les variations dont on vient de discuter sont dues uniquement aux quenchings non photochimiques, on a calculé, pour chacun des deux tracés, les valeurs des quenchings photochimiques. Le résultat obtenu montre que pour chaque pulse, la valeur du quenching photochimique est, respectivement pour la fluorescence et la photoacoustique, 45% et 10%. Cette composante photochimique est pratiquement inchangée dans les deux émissions, ce qui montre que l'intensité de la lumière utilisée pour les pulses ne provoque aucun effet photoinhibiteur qui pourrait altérer le quenching non-photochimique énergie-dépendant.

En conclusion, on peut dire qu'il existe une linéarité parfaite entre le quenching non photochimique de fluorescence et l'augmentation de l'émission thermique dans les thylacoïdes. Toutefois, il reste à déterminer les relations réelles qui lient ces deux émissions, l'étendue de la régulation thermique dans les membranes et les paramètres physiologiques qui la régissent. En se basant sur ces différents points, nous allons essayer d'apporter dans la suite de notre discussion une étude détaillée des mécanismes de la régulation thermique.

3. 2. 3. Etude du quenching non-photochimique thermique

Les données que nous avons présentées dans la section précédente montrent qu'il existe une corrélation très proche entre l'augmentation du quenching énergie-dépendant de la fluorescence et l'augmentation de l'émission thermique. Ce résultat est en accord avec celui obtenu dans les feuilles intactes (Weis et al., 1987) et souligne l'importance du mécanisme de q_E dans la régulation de l'émission thermique. Cette régulation, étant contrôlée par le gradient transthylacoïdien du proton, est sans doute influencée par l'état énergétique de la membrane, comme elle est sûrement affectée par les conditions environnementales ou par la présence de certains produits chimiques.

3. 2. 3. 1 Effet de Nigéricine/Valinomycine et de la Tentoxine

Parmi les produits qui ont été souvent utilisés pour évaluer les variations de l'état énergétique de la membrane thylacoïdienne, on trouve les découpleurs et certains inhibiteurs spécifiques. Dans le cadre de notre travail, d'une part, afin d'étudier l'effet de la diminution du ΔpH dans la membrane, nous avons opté pour un mélange de nigéricine/valinomycine en présence de K^+ . D'autre part, nous avons utilisé une solution de tentoxine, un inhibiteur classique de l'ATPsynthase, pour induire une augmentation de q_E (Quick et al, 1989). Les effets de ces produits, bien établis dans la littérature pour la fluorescence, ont été vérifiés au niveau du quenching de l'émission thermique. Cette méthodologie va nous permettre de mieux caractériser la relation qui existe entre l'acidification du lumen thylacoïdien et l'augmentation de l'émission thermique.

La valinomycine est un antibiotique naturel de *Streptomyces*. Sa partie externe est hydrophobe, ce qui la rend soluble dans les membranes biologiques où elle peut diffuser librement. La molécule a une forte affinité pour le K^+ , qui se fixe sous sa forme déshydratée dans la partie centrale de la molécule, et migre à travers la membrane. Ce transport permet de dissiper le gradient électrique qui se forme suite à l'absorption de la lumière. En présence de K^+ et de valinomycine, seul le ΔpH contribue à la formation du gradient électrochimique de protons (Finazzi et al., 1993).

La nigéricine présente un mode d'action aussi lié au K^+ , mais qui est électroneutre. Cette molécule, qui est un polyalcool-polyéther monocarboxylique, assure l'échange des K^+ contre les ions H^+ . Ce dernier type d'échange conduit à une dissipation du gradient de pH formé par le transfert des électrons à travers la membrane (Quik et al., 1989).

La tentoxine est un inhibiteur non réversible de la l'ATPsynthase (Sigalat et al, 1993). Elle a été déjà utilisée, en plus de son effet sur la production d'ATP, comme indicateur de variation de pH transmembranaire. Dans les travaux de Quick et ses coéquipiers (1989), la tentoxine a été utilisée spécifiquement pour induire une augmentation du ΔpH transthylacoïdien et a servi justement pour l'étude du quenching non-photochimique énergie-dépendant de la fluorescence.

La figure 15 illustre les tracés de fluorescence (côté gauche) et photoacoustique (côté droit) obtenus par l'addition de ces deux produits, comparés à ceux de l'échantillon contrôle. La figure du haut (fig. 15A), qui représente l'effet de la tentoxine, montre une diminution plus marquée des niveaux F_s que celle qui s'est produite pour le contrôle (Fig. 15B). Par contre, la diminution observée dans la figure du bas (fig. 15C), qui représente l'effet de la nigéricine/valinomycine, est moins importante que celle se produisant dans l'échantillon témoin. Ce résultat est en accord avec la littérature. Il nous fourni une base de comparaison fiable pour étudier les changements qui se produisent dans l'émission thermique.

Du côté droit de la figure 15, les variations obtenues dans les deux tracés du haut (fig. 15D) et du bas (fig. 15F), respectivement pour la tentoxine et la nigéricine/valinomycine, sont comparées d'une part au tracé de l'échantillon contrôle (fig. 15E) et d'autre part, parallèlement aux tracés relatifs de la fluorescence. Suite à l'addition de la tentoxine, une augmentation des niveaux de saturation de l'émission thermique se produit simultanément à la diminution des F_s citée plus haut. Cette augmentation thermique, comparée au contrôle, s'avère nettement plus accentuée. Dans le cas de la nigéricine/valinomycine, une très faible augmentation thermique se produit en parallèle à la diminution de l'émission de fluorescence.

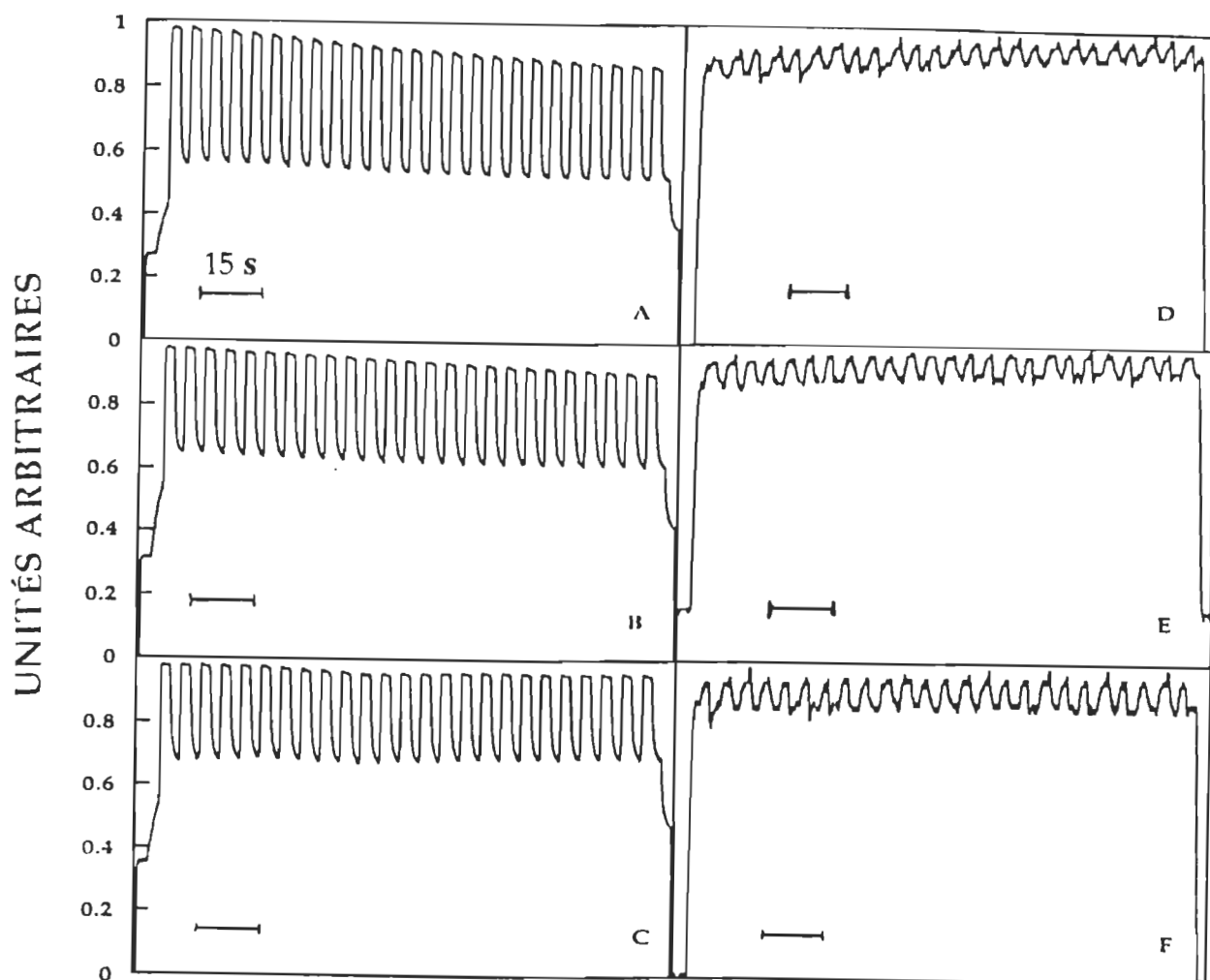


Figure 15 : Tracés représentatifs de l'émission de la fluorescence (côté gauche) et de l'émission thermique (côté droit) dans les membranes thylacoïdiennes. A et D en présence de $0.1 \mu\text{M}$ tentoxine. B et E échantillon contrôle. C et F en présence de $5 \mu\text{M}$ nigéricine/valinomycine. Les émissions de fluorescence et thermique sont représentées en unités arbitraires. Les pulses sont de 2 secondes et les périodes obscures de 3 s chacune. La constante de temps de l'appareil est de 30 ms. La mesure est à la température de la pièce.

La quantification de ces variations a été réalisée dans le but de déterminer le degré de corrélation qui se trouve entre les deux catégories spectrales, de fluorescence et thermique, et l'étendue de la régulation de l'émission thermique par les changements du ΔpH . Les courbes représentatives des quenching de fluorescence et photoacoustique en fonction des pulses sont montrées dans la figure 16. Ainsi, on remarque que pour chacun des traitements, le même type de corrélation entre l'émission de fluorescence et l'émission thermique que pour la figure 13 est obtenu. Le tableau 3 résume les résultats de cette expérience:

Quenching	Contrôle	Tentoxine	Nigéricine / Valinomycine
fluorescence	7.8 %	11.8 %	4.3 %
thermique	1.30 %	1.94 %	0.72 %
fluorescence / énergie totale	0.23 %	0.34 %	0.13 %
thermique / énergie totale	1.26 %	1.88 %	0.70 %
fluorescence / $q_N F'$ contrôle	100 %	148 %	56 %
thermique / $q_N Q'$ contrôle	100 %	149 %	55 %

Tableau 3 : Effets de 5 μM Nigéricine/Valinomycine et de 0.1 μM Tentoxine sur les émissions de fluorescence et thermique chez les thylacoïdes comparés à un échantillon contrôle non traité. Les valeurs sont prises au 25^{ème} pulse ce qui fait à 50 s d'illumination totale.

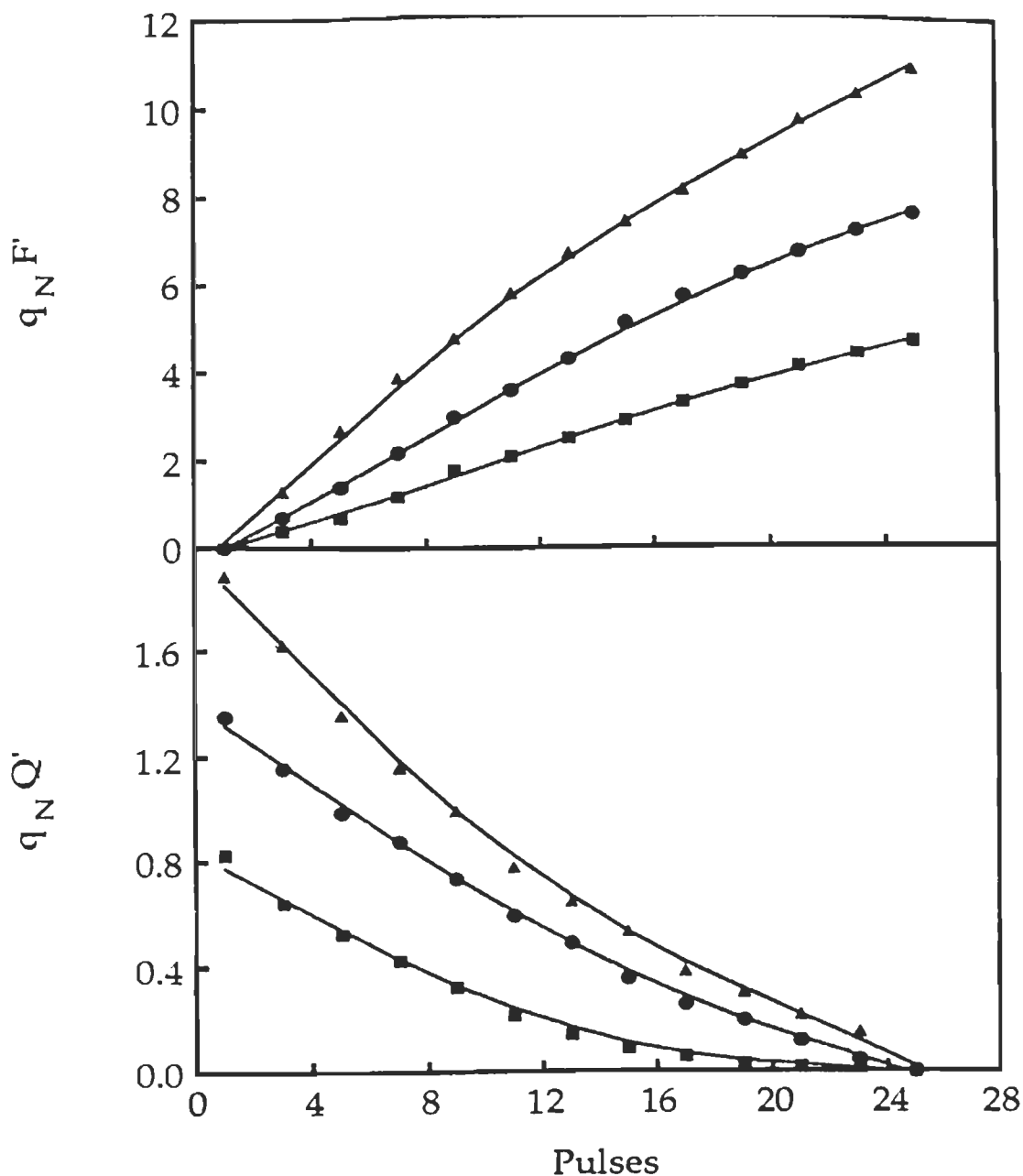


Figure 16 : Courbes représentatives des quenchings non-photochimiques de fluorescence (figure du haut) et thermique (figure du bas), en fonction du nombre de pulses chez les thylacoïdes. (▲) en présence de $0.1 \mu\text{M}$ de tentoxine, (●) échantillon contrôle et (■) en présence de $5 \mu\text{M}$ nigrécine valinomycine. Un pulse représente 2 s d'illumination saturante suivis de 3 s d'obscurité. Le temps total de l'expérimentation est 128 s. $q_N F'$ et $q_N Q'$ sont en pourcentages des émissions totales de fluorescence et photoacoustique respectivement. La constante du temps de l'appareil est 30 ms. La mesure est à la température de la pièce. Les valeurs sont des moyennes de 5 mesures répétées 3 fois.

Dans cette section, l'échantillon contrôle montre un quenching de fluorescence de près de 8 % de l'émission de fluorescence totale, alors que le quenching thermique est d'environ 1.3 %. Par rapport à l'énergie totale, on retrouve ici aussi un facteur de multiplication de 5 confirmant les résultats présentés dans la section précédente. Ici aussi, on peut dire qu'environ 0.7% de l'énergie totale est quenché de la fluorescence et est traduit en émission de chaleur, alors que le reste est dissipé directement par les CCLII.

L'addition de la tentoxine augmente le quenching à une valeur rapprochant les 12 %. C'est une augmentation d'environ 50 % par rapport au contrôle. Du côté thermique, le quenching augmente lui aussi de 1.3 à 1.9 %, ce qui représente une augmentation aussi de 50 % par rapport à l'échantillon contrôle. Nous remarquons que la proportionnalité est bien gardée. Dans le cas de la nigéricine/valinomycine, le quenching de fluorescence n'atteint que 4% environ et le quenching thermique est de 0.7 %. Ici, les deux quenchantes ne représentent que près de 50 % du quenching de l'échantillon contrôle. Si l'on considère ici aussi la relation qui lie les deux catégories d'émissions en fonction du temps et pour chacun des échantillons, nous pouvons voir, d'après la figure 17, que cette relation est parfaitement linéaire.

Les changements énergie-dépendants de la fluorescence qui affectent q_F , se faisant généralement dans une durée de temps très brève, peuvent être considérés comme un moyen de régulation à court-terme de la dissipation de l'excès de l'énergie d'excitation (Krause et al., 1988). Nous avons démontré, par l'utilisation des mesures spectroscopiques simultanées de la fluorescence et thermique, que ces variations dans le quenching de fluorescence et de dissipation thermique sont concomitantes. Le résultat présenté ici, déjà postulé mais non démontré expérimentalement par les travaux de Krause et al. en 1988, montre que l'augmentation de l'émission thermique se fait aussi vite que la diminution de la fluorescence. Par conséquent, on peut suggérer que la régulation thermique de la dissipation de l'énergie lumineuse, indiquée par le quenching énergie-dépendant simultané de la fluorescence, fournit un mécanisme à court terme capable d'ajuster, de façon optimale, l'appareil photosynthétique aux conditions de la lumière.

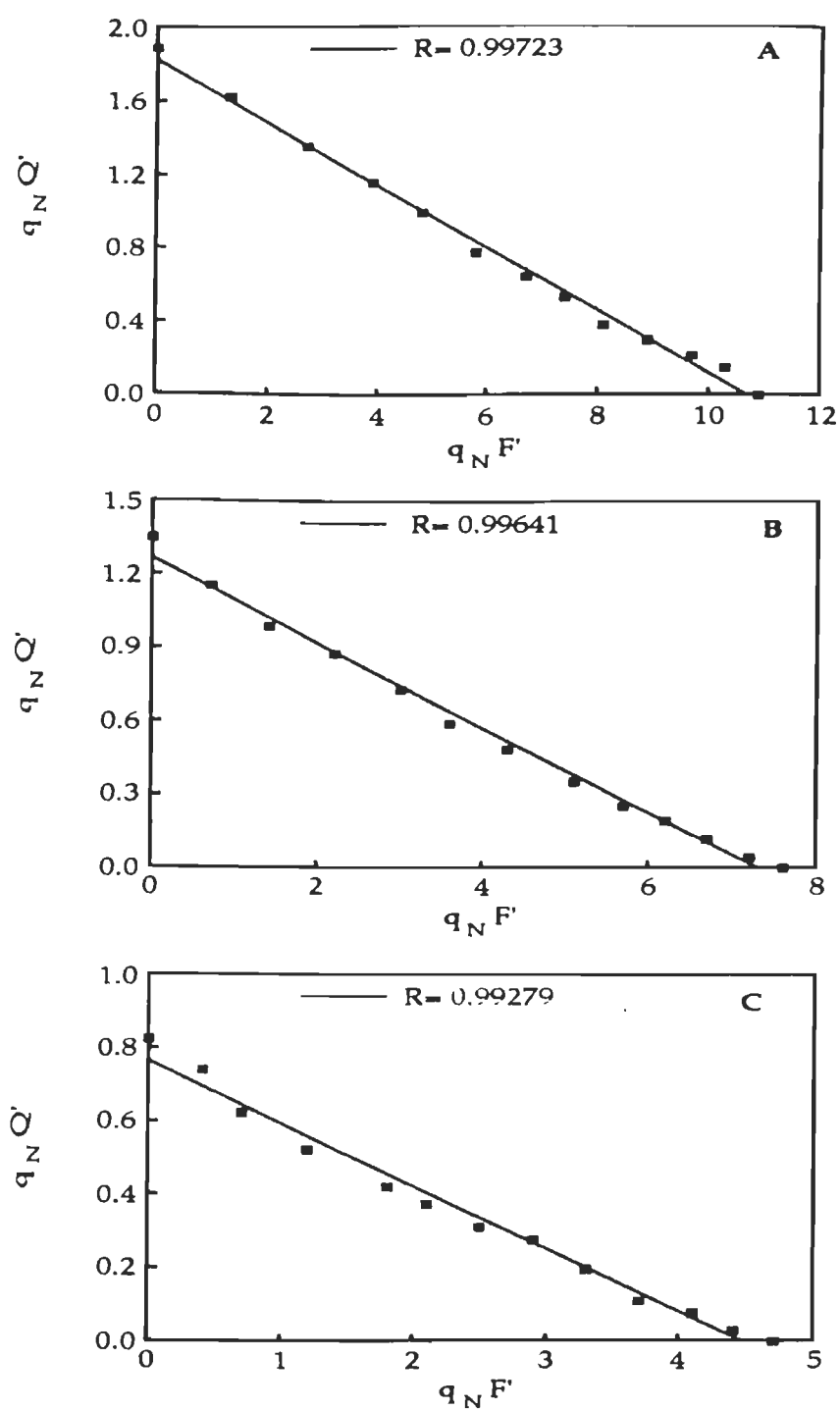


Figure 17 : Courbes de corrélation entre les quenchings non-photochimiques de fluorescence $q_N F'$ et thermiques $q_N Q'$ chez les thylacoïdes. (A) en présence de $0.1 \mu\text{M}$ tentoxine, (B) échantillon contrôle et (C) en présence de $5 \mu\text{M}$ nigéricine / valinomycine.

3. 2. 3. 2. Effet de la procaine

Parmi les découpleurs aminés qui ont été utilisés pour l'étude du quenching non photochimique de la fluorescence, on retrouve le cas de l'acide (2-diméthylaminoéthyl) 4-aminobenzoïque ester, appelé procaine. C'est un anesthésique local aminé qui, comparé aux autres découpleurs aminés "classiques", présente un mode d'action sélectif vis à vis du ΔpH . Cette sélectivité fut à la base du choix de ce produit dans notre travail. La procaine est classée parmi les découpleurs locaux car elle inhibe le ΔpH mais pas le flux d'électrons pH-dépendant (Laash et al., 1993). L'intrigante propriété de ce découpleur, qui consiste la maintenance de la constance du quotient $\text{ATP}/2e^-$ même à un large niveau de diminution de ΔpH , est due à l'augmentation de la perméabilité apparente de la membrane aux protons. En outre, en présence de la procaine, la formation du ΔpH n'est pas contrebalancée par une augmentation du gradient électrique ΔY .

Quelques hypothèses ont été avancées pour expliquer les effets des anesthésiques locaux dans la désexcitation de la membrane. Il a été proposé que l'interférence de ces éléments avec les charges électriques des surfaces membranaires et leurs liaisons aux complexes des récepteurs protéiques spécifiques en sont responsables (Laash et al., 1993). Dans les travaux de Laash et al. (1993), il a été suggéré que l'effet inconventionnel de la procaine sur la diminution sélective du ΔpH est relié à ses effets sur le complexe du cytochrome b_6f . Il apparaît que sous l'effet de la procaine il se produit réellement un découplage entre les protons de la phase luminale et leur flux à travers les complexes des ATPases. En effet, sous l'action de la procaine, le couplage énergétique est déplacé vers un compartiment interne à la membrane, il est dit dans ce cas couplage localisé. Ce couplage protonique se produit entre le complexe du Cyt b_6f et les complexes des ATPases. Il offre un chemin préférentiel pour les protons qui sont directement transférés à l'ATPsynthase et ne sont plus, par conséquent, déversés dans le compartiment luminal. Le résultat immédiat du déplacement du couplage énergétique d'un mode délocalisé à un mode localisé est la diminution du pH intrathylacoïdien.

L'existence des domaines membranaires séparés du compartiment luminal, et qui présente un mode de couplage protonique différent, a été largement discuté durant les toutes dernières années. Un des modèles les plus acceptés de ce couplage est celui présenté par Dilley (1991), il est basé sur l'idée qu'il existe un compartiment membranaire aqueux entre les protéines intrinsèques de la membrane et les protéines extrinsèques du côté luminal. Ces dernières forment une sorte de barrière qui sépare ce domaine de la phase aqueuse du lumen. Cette barrière peut toutefois être levée par un déplacement d'ions Ca^{2+} spécifiques qui ouvre un passage permettant l'équilibration des protons des domaines localisés avec ceux de la phase luminale.

D'après la figure 18, l'addition de la procaine aux membranes thylacoïdiennes montre, comme dans le cas de la nigéricine/valinomycine, qu'il se produit une diminution de q_{NF} par rapport au contrôle, accompagnée d'une diminution de l'émission thermique. Ces variations peuvent être interprétées comme une réponse directe à la diminution de l'acidité du lumen thylacoïdien. Différemment du cas de la nigéricine/valinomycine, les quenchings énergie-dépendants observés sous l'effet de la procaine sont strictement contrôlés par la variation du pH luminal.

La corrélation entre les valeurs de ces deux quenchings est illustrée dans la figure 19. La parfaite linéarité entre les deux quenching vient confirmer de façon générale l'effet des découpleurs sur l'émission de chaleur dans les thylacoïdes. En fait, la différence majeure qui se trouve entre le couplage énergétique localisé dans les domaines membranaires et le couplage diffus dans le lumen se limite à la quantité de protons présents dans l'espace interthylacoïdien et n'affecte pas du tout l'état énergétique de la membrane. Ainsi, il devient parfaitement clair que l'effet de la procaine, qui est identique à celui des autres découpleurs, provient uniquement de la variation du pH luminal. En conclusion, par l'utilisation de la procaine, nous avons démontré que l'émission de chaleur, et par conséquent celle de la fluorescence, sont spécifiquement contrôlés par la variation du pH luminal et non par l'état énergétique de la membrane. Ce résultat est d'une importance physiologique capitale au point qu'il pourrait suggérer de remettre en question la nomenclature même du quenching énergie-dépendant.

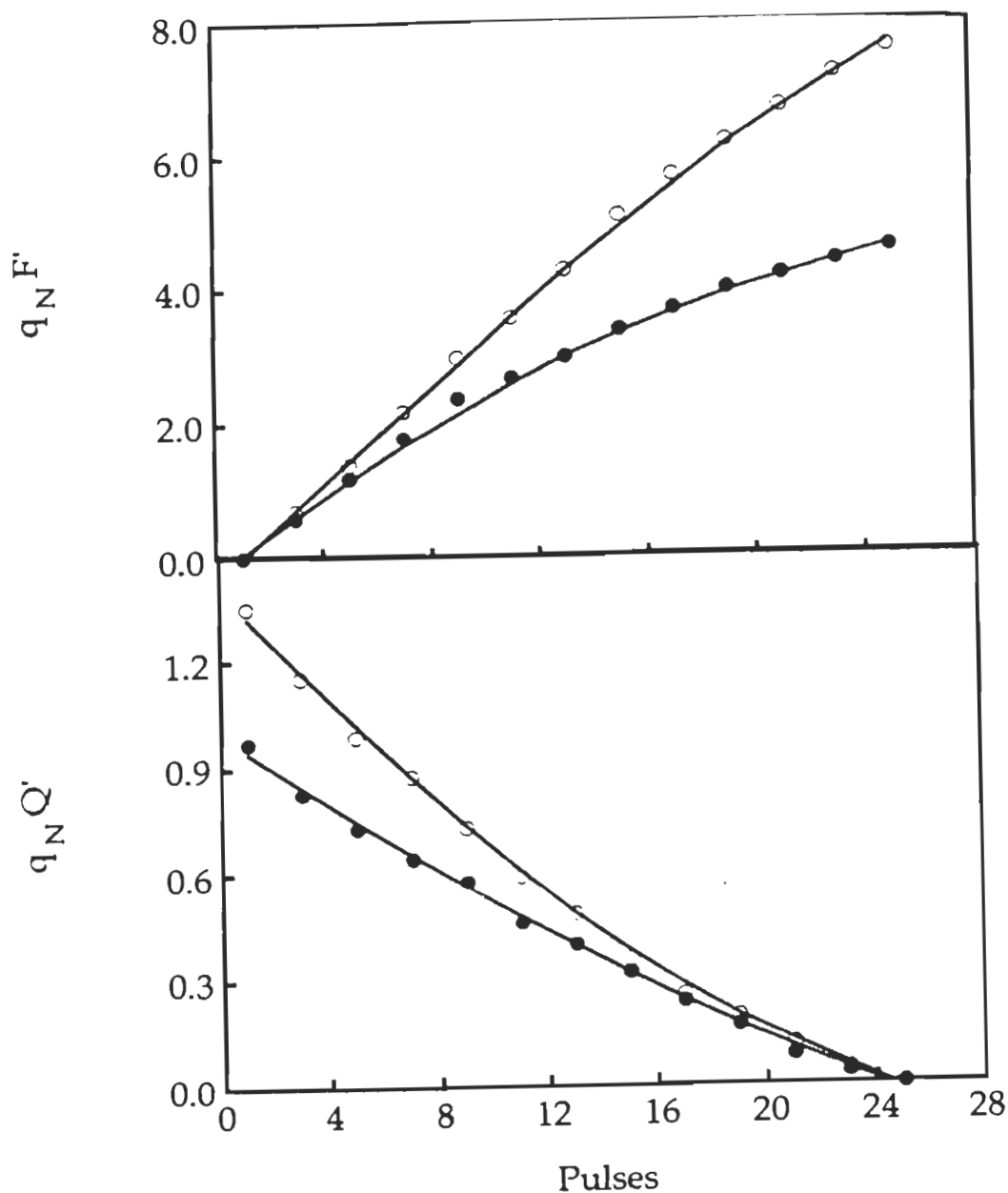


Figure 18 : Courbes représentatives des quenchings non-photochimiques (figure du haut) et thermique (figure du bas), en fonction du nombre de pulses chez les thylacoïdes, en absence (o) et en présence (●) de 5 mM procaine. Un pulse représente 2 s d'illumination saturante suivis de 3 s d'obscurité. Le temps total de l'expérimentation est 128 s. $q_{NF'}$ et $q_{NQ'}$ sont en pourcentages des émissions totales de fluorescence et photoacoustique respectivement. La constante du temps de l'appareil est 30 ms. La mesure est à la température de la pièce. Les valeurs sont des moyennes de 5 mesures répétées 3 fois.

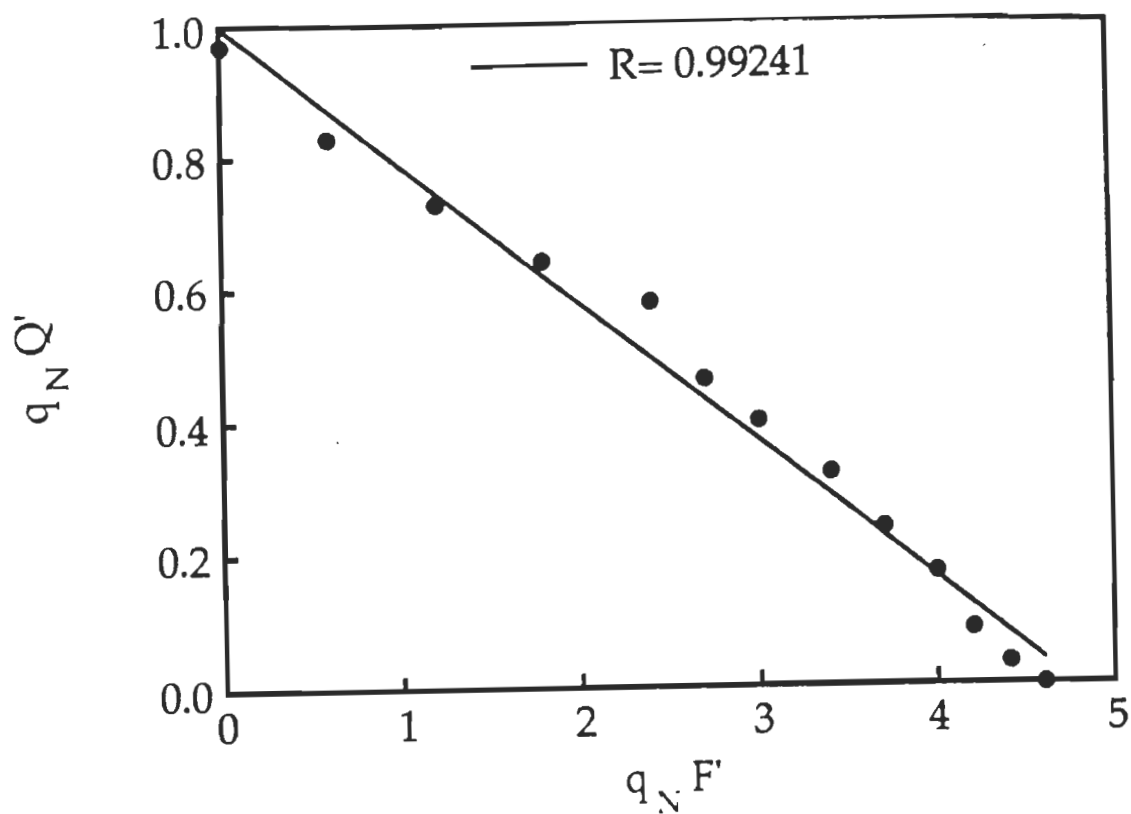


Figure 19 : Courbes de corrélation entre le quenching non-photochimique de fluorescence $q_N F'$ et le quenching non-photochimique thermique $q_N Q'$ chez les thylacoïdes en présence de 0.5 mM procaine. Les valeurs sont en pourcentages des émissions totales de fluorescence pour $q_N F'$ et thermique pour $q_N Q'$.

3. 2. 3. 3. Effet du DCCD

Le dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) est un carbodiimide hydrophobe qui possède une très haute activité avec quelques groupements organiques. A la température ambiante et à un pH relativement neutre, DCCD réagit principalement avec les groupements carboxyles (Azzi et al., 1984). Dans les chloroplastes, il se lie généralement de façon covalente à la sous-unité III du canal de protons, CF₀ et bloque ainsi la conduction des protons à travers l'ATPase (McCarty et Racker, 1967).

Quand il est présent en haute concentration, DCCD peut inhiber le transport d'électrons (Sane et al., 1979). Toutefois, à des concentrations plus faibles que celles nécessaires à l'inhibition du transport des électrons, DCCD peut avoir un autre type d'action dans les chloroplastes. D'après Jans et al. (1988), DCCD affecte directement les réactions protoniques autour du PSII en court-circuitant l'activité du pompage des protons. Les lignes qui vont suivre vont donner une explication sommaire de cette réaction.

L'oxydation de l'eau dans les thylacoïdes est accompagnée par le relâchement des protons dans le lumen (Förster et Junge, 1985). Il se produit une réduction concomitante des liaisons quinones, qui provoque la capture des protons à partir du côté stromal de la membrane. Des preuves cinétiques montrent que les cofacteurs redox impliqués dans ces deux réactions ne sont pas en contact direct avec la phase aqueuse. La combinaison de la rapide séparation des charges avec les deux réactions protoniques, qui se passent des deux côtés opposés de la membrane, fait que le complexe enzymatique de l'oxydase eau-plastoquinone agisse comme pompe électrogénique de protons.

En présence de DCCD à faible concentration, une remarquable diminution du ΔpH luminal est observée. Elle est causée par l'arrêt de l'extrusion des protons, provenant du clivage de l'eau, dans le lumen. Cependant, aucun effet sur la capacité de dégagement d'oxygène n'a été reporté. Le mécanisme moléculaire qui explique cet effet a été surtout discuté dans les travaux de Jans et al. (1990) en généralisant à tous les composés de formule (cHxN)₂C.

La réaction du court-circuitage induite par DCCD semble se faire à travers des modifications covalentes de deux polypeptides du PSII de masses moléculaires 20 et 24 KDa. Tout d'abord, ces protéines ont été reliées aux protéines du complexe de dégagement d'oxygène. Par la suite, dans des études plus récentes, elles ont été identifiées comme étant reliées au complexe collecteur de lumière du PSII du côté luminal (Jans et al., 1990). Ainsi, ces protéines, en plus de servir comme antennes collectrices de lumière, peuvent avoir une fonction additionnelle qui est la canalisation, dans le lumen, des protons produits dans le centre catalytique du Mn à partir de l'oxydation de l'eau. Ces protéines sont donc responsables de l'acheminement des protons soit vers le lumen, soit vers les quinones réduites à travers la membrane.

Les courbes obtenues d'après les calculs des quenchings de la fluorescence et la photoacoustique sont montrées dans la figure 20. Suite à l'addition du DCCD, on observe une diminution du quenching de fluorescence par rapport au contrôle, qui est parallèle à la diminution du quenching thermique. Les deux quenchings passent de 8 % et 1.4 % à 4 % et 0.7 % simultanément pour les émissions de fluorescence et de chaleur.

En effet, l'inhibition du quenching de la fluorescence pH-dépendant par DCCD a été tout récemment étudiée par Ruban et al. (1992 a). Consistant avec les travaux de Jans et al. que nous avons cités précédemment, ils ont montré qu'il se produit, suite à la présence du DCCD, une inhibition de q_NF . D'après ces auteurs, cette inhibition est plutôt associée à l'acidification du lumen mais non causée par elle.

La figure 21, qui illustre la corrélation entre les quenchings de fluorescence et thermique, peut confirmer d'avantage le fait que dans les membranes thylacoïdiennes, quelque soit l'origine de la variation du pH luminal elle se traduit par une variation simultanée et parallèle des émissions de fluorescence et thermique.

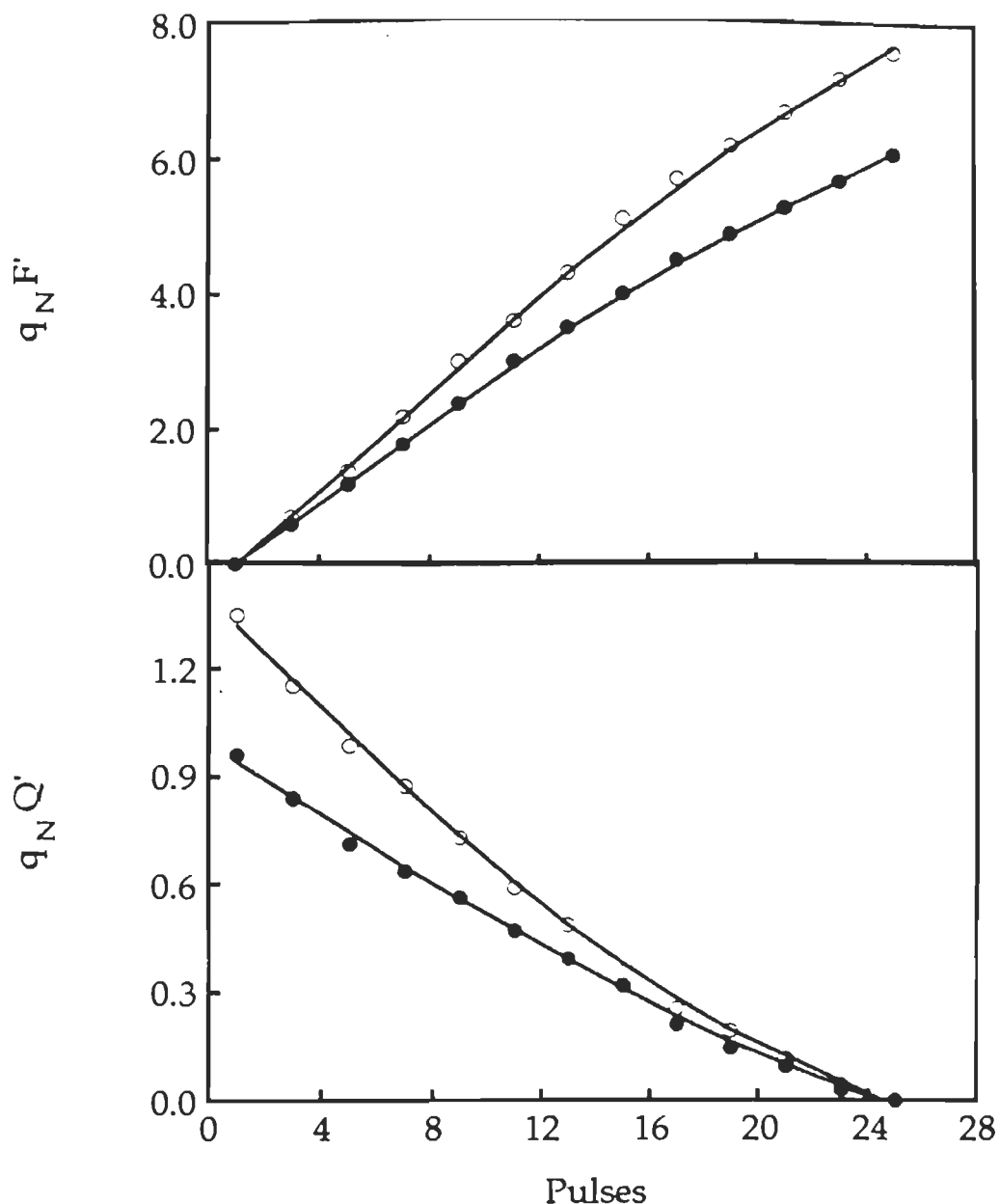


Figure 20 : Courbes représentatives des quenchings non-photochimiques de fluorescence (figure du haut) et thermique (figure du bas), en fonction du nombre de pulses chez les thylacoïdes, en absence (o) et en présence (●) de 0.5 mM DCCD. Un pulse représente 2 s d'illumination saturante suivis de 3 s d'obscurité. Le temps total de l'expérimentation est 128 s. $q_N F'$ et $q_N Q'$ sont en pourcentages des émissions totales de fluorescence et photoacoustique respectivement. La constante du temps de l'appareil est 30 ms. La mesure est à la température de la pièce. Les valeurs sont des moyennes de 5 mesures répétées 3 fois.

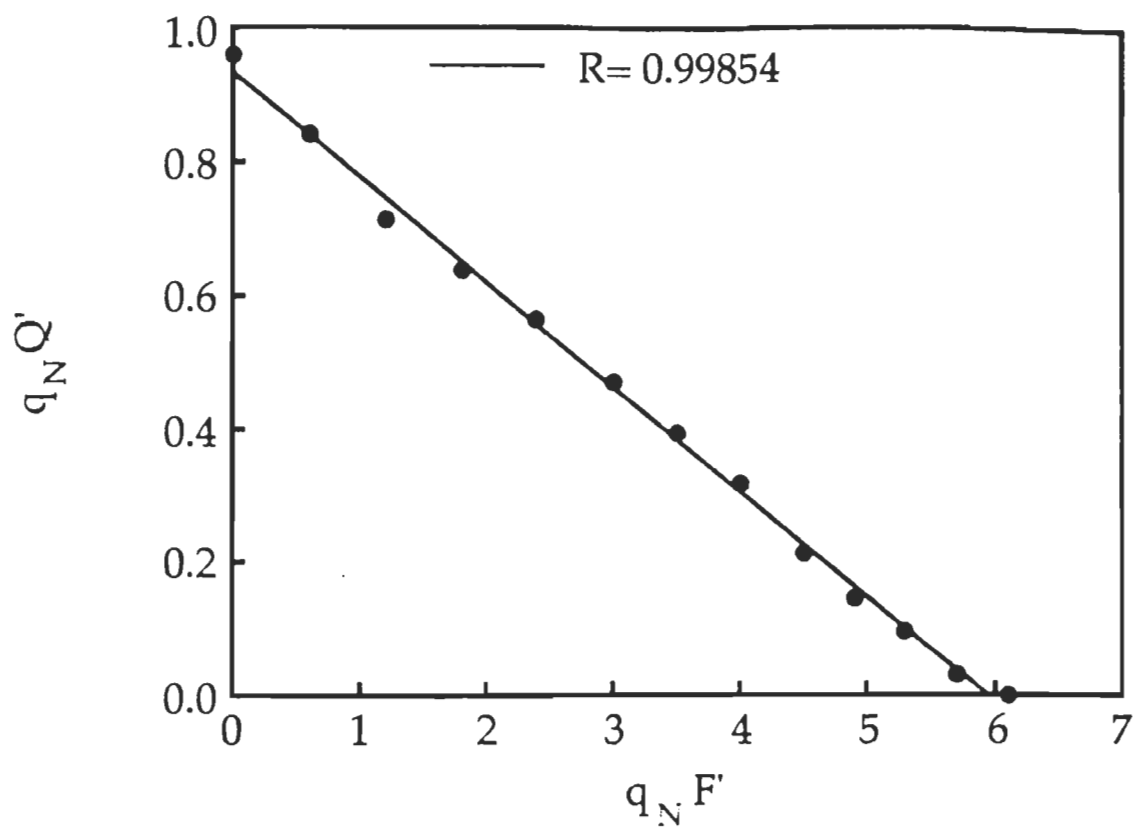


Figure 21 : Courbe de corrélation entre le quenching non photochimique de fluorescence $q_N F'$ et le quenching non photochimique thermique $q_N Q'$ en présence de DCCD.

3. 2. 3. 4. Effet de l'Ascorbate

Parmi les systèmes d'adaptation de l'appareil photosynthétique aux conditions de la PFD, la variation pigmentaire des antennes collectrices de lumière tient une place primordiale. Les pigments accessoires, qui accompagnent la chlorophylle dans ces systèmes, jouent le rôle clé dans cette adaptation. Ainsi, en cas de forte luminosité, la plante ne pouvant utiliser toute l'énergie absorbée dans ses réactions photochimiques, met en action une suite d'autres mécanismes fonctionnels pratiquement à tous les niveaux.

En effet, une majorité de chercheurs considéraient "le lit chlorophyllien" comme le site de préférence pour les réponses photoprotectrices. La phosphorylation des CCLII périphériques représente le mode le plus spectaculaire à ce niveau. Pourtant, il semblerait que cette phosphorylation n'est pas directement liée à l'excès de lumière (Gilmore et Yamamoto, 1992). En outre, le fait qu'une grande quantité de l'énergie d'excitation soit dissipée de façon non-radiative suggère qu'un autre mécanisme, probablement lié aux pigments accessoires, soit responsable de cette protection.

Les travaux récents de Gilmore et Yamamoto (1992, 1993) démontrent l'implication des xanthophylles dans la dissipation non-radiative de l'excès de l'énergie. Cette dissipation est responsable d'une grande partie du quenching non photochimique de type réversible lent, aussi bien que de la relaxation rapide du même quenching observé en "haut état énergétique". Pour ce dernier type de quenching, il s'est avéré que les calculs de la dissipation non-radiative de l'énergie présentent une grande corrélation avec la quantité de zéaxanthines présents dans les échantillons (Demming-Adams, 1990).

Le cycle des xanthophylles est composé de deux réactions enzymatiques: l'époxydation de la zéaxanthine (β,β' -carotène-3,3'-diol) via l'antheraxanthine (5,6-époxy-zéaxanthine) en violaxanthine (5,6,5',6'-diépoxy-zéaxanthine), et la déépoxydation de la violaxanthine via l'antheraxanthine en zéaxanthine (fig 22). La violaxanthine déépoxydase qui nécessite la présence absolue de l'ascorbate, a été isolée et semble être une protéine soluble dans l'eau de 54 KDa. Son pH optimal de 5 indique sa localisation du côté luminal de la membrane thylacoïdienne (Hager et Holocher, 1994).

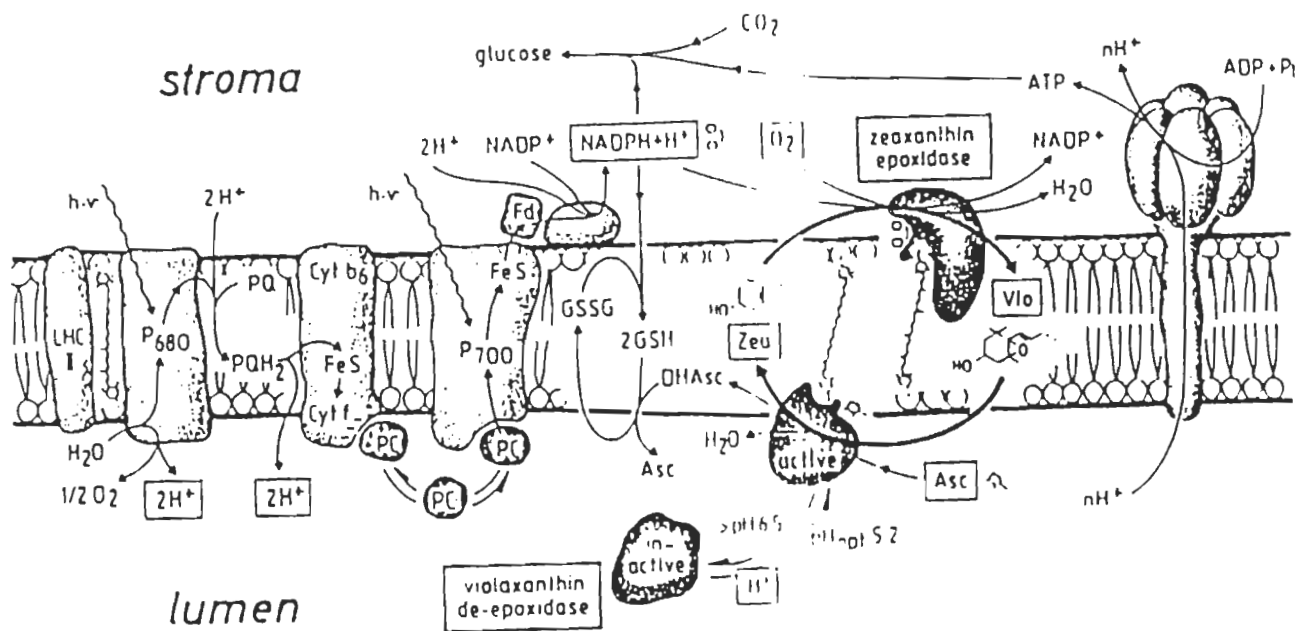


Figure 22 : Schéma représentatif du cycle des xanthophylles et de son mode probable d'action et de régulation au sein de la membrane photosynthétique.

la violaxanthine epoxydase n'a pas été isolée jusqu'à présent mais, selon des expériences de lavages, elle semble être une protéine encrée dans la membrane. Une étude récente de Gruszeski et Krupa (1993) indique fortement que c'est le CCLII qui joue le rôle de cet enzyme et un modèle très détaillé y a été présenté. Toutefois, malgré le grand nombre d'études menées dernièrement sur ces CCLII et leur relation avec le quenching énergie-dépendant, le mécanisme exact de ce phénomène demeure inconnu. Plusieurs groupes semblent adopter l'idée que ces CCLII assument leur rôle protecteur en changeant de conformation probablement sous l'effet de la protonation induite par l'acidité du lumen. D'après Kühlbrandt (1991), les CCLII semblent adopter une configuration en trimères au sein de la membrane. Cette conformation conserve une telle association fonctionnelle, le système membranaire nécessite sans doute de l'énergie qui se trouve alors emprisonnée dans les liaisons peptidiques et hydrogènes. Sous l'effet de la protonation provoquée par l'acidification du lumen, les CCLII subissent probablement une dissociation de la configuration trimérique et libèrent alors thermiquement la quantité d'énergie qui était emmagasinée dans les liaisons de leurs unités. Une fois dissociés, les monomères des CCLII ne sont plus fonctionnels et sont plus susceptibles à des réactions d'agrégation qui peuvent être responsables de l'apparition du quenching non photochimique de fluorescence et de l'augmentation de l'émission thermique dans ces conditions. Ce modèle peut expliquer l'effet inhibiteur de l'antimycine A qui agit comme détergent et empêche l'agrégation des CCLII. Le même effet est observé par l'addition de la violaxanthine (Ruban et al., 1994). Toutefois, où se situe l'effet des xanthophylles dans ces réactions et qu'elle régulation apportent ils à l'émission thermique lors du quenching de la fluorescence amplifié par leur présence.

La figure 23 (côté droit) montre les tracés de fluorescence et photoacoustique obtenus après l'addition de l'ascorbate. Comparés aux tracés contrôles (côté gauche), le tracé de fluorescence (B) présente des variations non photochimiques très marquées qui ne semblent pas exister dans le tracé thermique (D); le tracé photoacoustique semble ne pas être très affecté par l'ascorbate du moins du côté non photochimique.

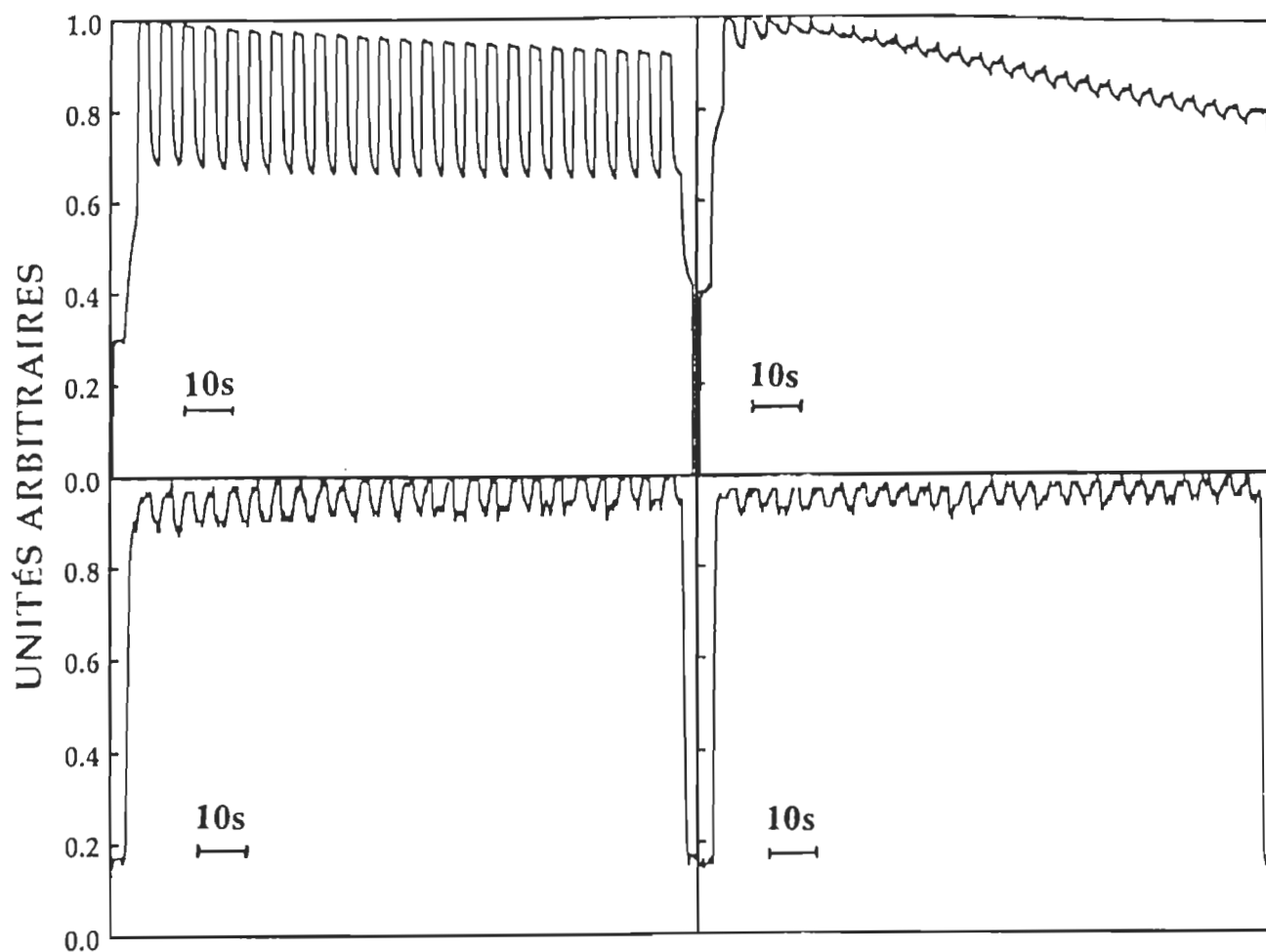


Figure 23: Tracés représentatifs des émissions de fluorescence et thermique dans les membranes thylacoïdiennes, avant (côté gauche) et après (côté droit) addition de 60 mM d'ascorbate afin d'activer le cycle des xanthophylles. Les émissions de fluorescence et thermique sont représentées en unités arbitraires. Les pulses sont de 2 secondes et les périodes obscures de 3 s chacune. La constante de temps de l'appareil est de 30 ms. La mesure est à la température de la pièce.

L'analyse des courbes des quenchings thermique et de la fluorescence présentées dans la figure 24 montre que de façon parfaitement conforme à la littérature, le quenching de fluorescence augmente. Ainsi, nous pouvons constater facilement que près de 25% de la quantité totale de fluorescence émise ont été quenchés. Cette valeur montre clairement l'effet amplificateur de l'activation du cycle des xanthophylles sur le quenching non-photochimique de fluorescence. Toutefois, en se basant sur les mêmes sources bibliographiques, cette augmentation de q_{NF} devrait se traduire par une augmentation parallèle et proportionnelle de l'émission thermique. Les résultats obtenus dans notre cas donnent des valeurs complètement contradictoires aux résultats attendus pour l'émission thermique. En effet, alors que l'on s'attendait à une grande augmentation de l'émission thermique, qui accompagnerait l'augmentation du quenching non photochimique de fluorescence, on n'a obtenu aucune différence vis à vis du tracé contrôle à ce niveau.

Dans le but de s'assurer que la stabilité du dégagement de chaleur, même à grand niveau d'amplification du quenching de la fluorescence, est indépendante du taux d'activation du cycle des xanthophylles, nous avons vérifié l'effet de l'augmentation progressive de la concentration de l'ascorbate, allant de 0 à 60 mM, sur les émissions simultanées de fluorescence et de chaleur. La figure 25, qui illustre le résultat de cette expérience, montre de façon indiscutable que l'augmentation du quenching non photochimique de l'émission de fluorescence est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de l'ascorbate. Par contre, aucune variation de l'émission thermique ne suit cette évolution et le maximum du quenching non photochimique ne dépasse pas les 1.2 % de l'énergie totale absorbée noté dans le cas du contrôle.

Ce résultat semble contredire toutes les corrélations entre les quenchings de fluorescence et l'émission thermique que nous avons présentées depuis le début de ce travail. Toutefois, considérant le mode d'action de l'ascorbate dans le cycle des xanthophylles, que nous présenterons dans le paragraphe prochain, nous avons pu expliquer ce résultat en étudiant la relation entre le bilan énergétique thermique total et le cycle des xanthophylle, ainsi que les états d'agrégation et de désagrégation des CCLII.

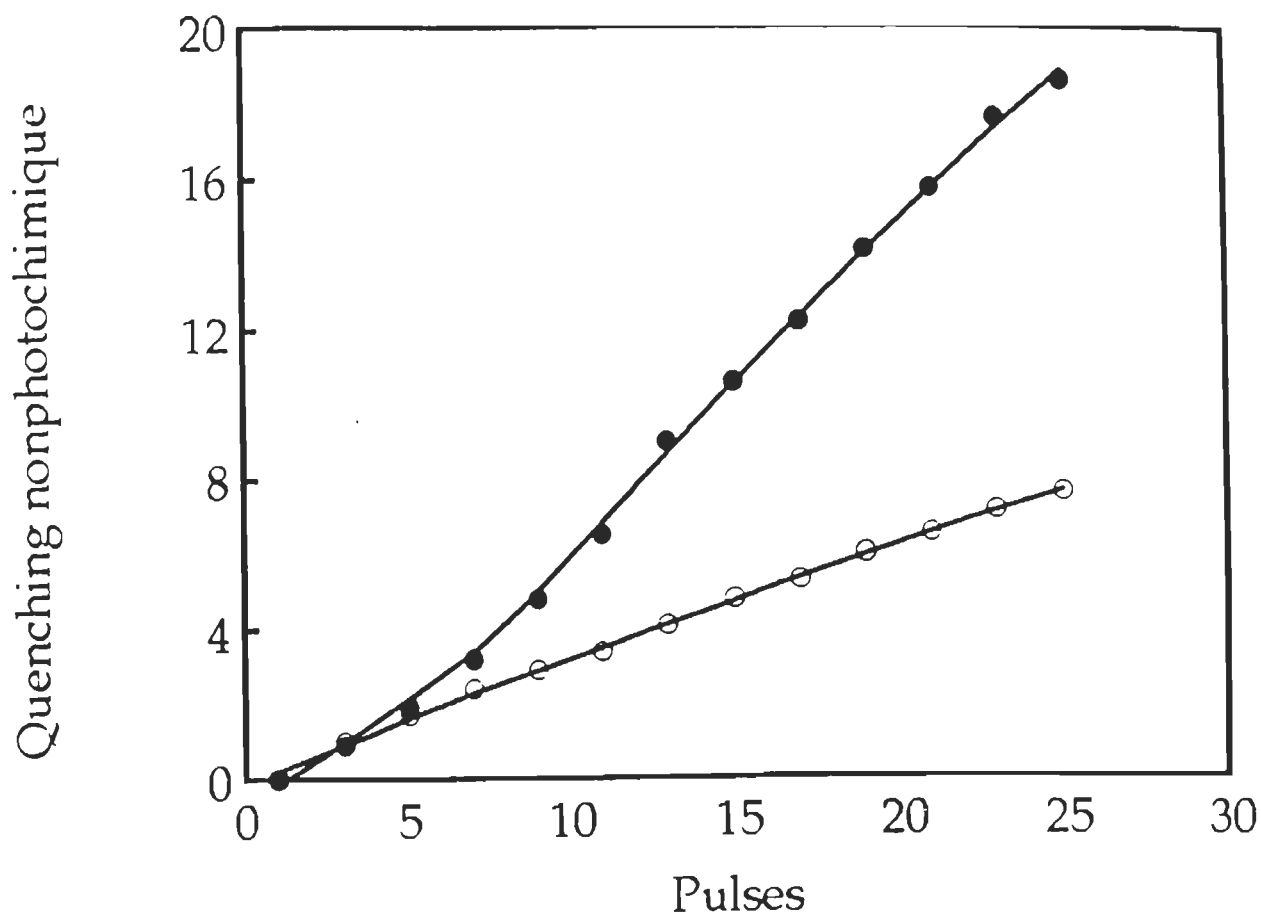


Figure 24 : Courbes représentatives du quenching non-photochimique , de fluorescence en fonction du nombre de pulses chez les thylacoïdes, en absence (o) et en présence (●) de 60 mM d'ascorbate. Un pulse représente 2 s d'illumination saturante suivis de 3 s d'obscurité. Le temps total de l'expérimentation est 128 s. Le quenching non-photochimique est présenté en pourcentages de l'émissions totale de fluorescence. La constante du temps de l'appareil est 30 ms. La mesure est à la température de la pièce. Les valeurs sont des moyennes de 5 mesures répétées 3 fois.

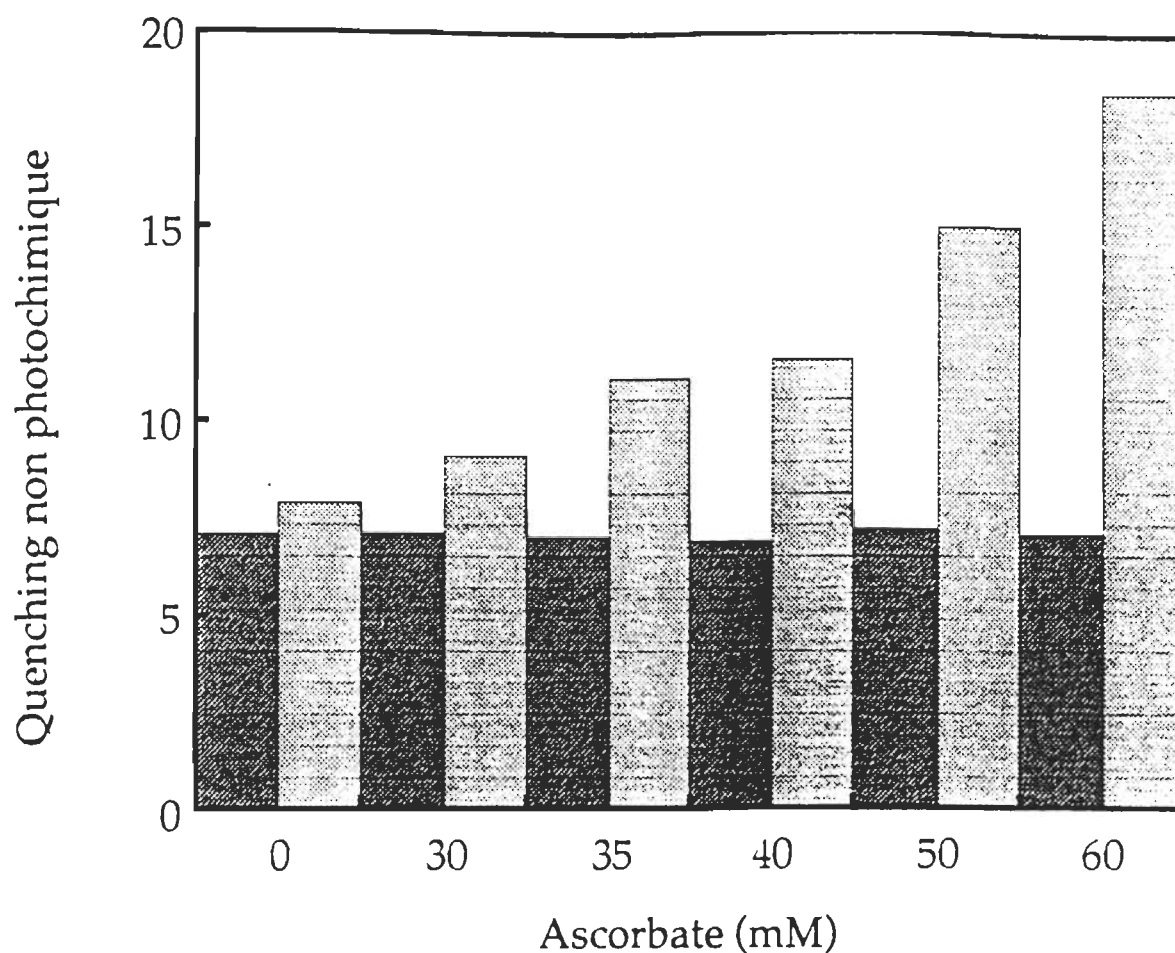


Figure 25 : Effet de la concentration d'ascorbate sur les quenchant non-photochimiques de fluorescence et thermique dans les membranes thylacoïdiennes. Les bandes claires représentent le quenching non-photochimique de fluorescence et les bandes sombres le quenching non-photochimique thermique. Les valeurs des quenchant sont des moyennes de 5 mesures et sont représentées en pourcentages des émissions de fluorescence et thermique.

L'ascorbate n'est pas directement impliqué dans le cycle des xanthophylles, sa présence est cependant obligatoire pour l'activité de la violaxanthine déépoxydase (VDE). Ainsi, suite au changement de pH luminal, le cycle des xanthophylles est activé. Il présente une suite de réactions enzymatiques, impliquant toutes des CCLII agrégés (Ruban et al., 1993) et qui devraient nécessiter une bonne quantité d'énergie pour se faire. La source la plus probable, et qui pourrait expliquer l'utilité du cycle lui même, est la consommation de l'excès d'excitation sous forme de chaleur.

D'après notre résultat, et se basant sur le modèle probable du cycle des xanthophylles présenté par Gruszecki et Krupa (1993), nous proposons un schéma de ce cycle capable d'expliquer à la fois l'augmentation du quenching de fluorescence et la stabilité de l'émission thermique malgré la concentration croissante de l'ascorbate.

Le modèle atomique du CCLII présenté par Kuhlbrandt et al. (1994) suggère que les caroténoïdes qui leur sont associées, et qui participent dans le cycle des xanthophylles, se trouvent en quantités sous-stoichiométriques, et semblent être localisées à la périphérie du complexe. D'autre part, il a été rapporté par Hager et Holocher que 70-80% des violaxanthines sont libres dans la bicouche lipidique, ce qui fait qu'elles sont très accessibles pour leur enzyme lors de la déépoxydation. De plus, il paraît qu'à l'état stationnaire, les CCLII sont assemblés en trimères (Kuhlbrandt et Wang, 1991) et donc n'abritent pas les violaxanthines qui se retrouvent libres dans la phase lipidique.

Lors d'une acidification du lumen, que ce soit par les réactions photochimiques ou par l'hydrolyse d'ATP à l'obscurité (Gilmore et Yamamoto, 1992), une protonation des CCLII se produit conduisant à leur dissociation en monomères et par la suite à leur agrégation. Cette réaction résulte en l'émission de chaleur et en quenching de fluorescence dans les CCLII. L'addition de l'antimycine A ou de la violaxanthine inhibe la dissociation en monomères des CCLII et permet par conséquent de renverser le quenching. L'antimycine A et la violaxanthines agissent donc comme détergents capables de contrer l'effet de l'acidité du lumen qui provoque l'agrégation des monomères CCLII dissociés (Ruban et al, 1994).

In vivo, l'ascorbate est toujours présent à des concentrations importantes dans la phase aqueuse, et suite à la diminution du pH du côté luminal, il réduit la violaxanthine grâce à la violaxanthine déépoxydase qui vient elle aussi se fixer à la membrane. Cette réaction semble se faire dans un complexe pigment-protéine qui traverse l'épaisseur de la membrane (Thayer et Björkman, 1992). Cette idée semble de plus en plus probable et nous pensons, d'après le modèle atomique des CCLII (Kuhlbrand et al, 1994), que c'est bien le CCL II qui supporte les violaxanthines pendant la réaction de la déépoxydation. Cette idée vient du fait que lors de l'isolation de la violaxanthine déépoxydase, on retrouve des fragments des CCLII. D'autre part, le modèle atomique des CCLII présenté par Kuhlbrand et al. (1994) montre que ce dernier comporte une petite hélice- α du côté luminal de la membrane appelée sous-unité D, dont les caractéristiques d'hydrophobicité ressemblent fortement à celles de la violaxanthine déépoxydase. Il se pourrait que la violaxanthine déépoxydase vienne s'adsorber au complexe collecteur de lumière grâce à cette hélice, à moins que cet enzyme ne soit une partie intégrante de ce complexe.

Evidemment, cette hypothèse nécessite de plus amples preuves, elle reste néanmoins très probable étant donné que cette partie amphiphile peut facilement se détacher de la membrane. D'ailleurs, cette suggestion s'avère très compatible avec le modèle des domaines membranaires localisés présenté par Dilley (1991) et qui semblent être bloqués par la fermeture du canal interne des protons suite à l'adsorption de cet enzyme. Le rôle de l'interconversion du mode de couplage énergétique a été aussi postulé dans l'activation du cycle des xanthophylles (Dilley, 1991).

Une fois les zéaxanthines formées, elles sont immédiatement transformées en violaxanthines qui sont nécessaires pour préserver les CCLII de l'effet destructeur de l'acidité. Cette époxydation nécessite de l'oxygène moléculaire et NADPH et se fait du côté stromal de la membrane. Toutefois, la réaction de la déépoxydation étant plus rapide que celle de l'époxydation, il en résulte une accumulation très rapide des zéaxanthines, ce qui pendant longtemps a relié la concentration croissante de ces dernières à la formation du quenching de la fluorescence. L'époxydation se fait alors probablement au niveau de l'extrémité stromale des autres hélices- α du CCLII.

En conclusion, d'après le modèle que nous suggérons, il se forme lors du cycle des xanthophylles, mis en action par l'acidification du lumen, trois formes quenchés de CCLII, d'ailleurs déjà prédites par les analyses spectroscopiques des CCLII isolés (Ruban et Horton, 1992; Ruban et al, 1992 b):

1- Les CCLII protonés et qui sont responsables de l'émission de chaleur notées lors du quenching de la fluorescence.

2- Les CCLII associés aux violaxanthines lors de la déépoxydation de ces derniers, et qui présentent une émission de fluorescence plus basse que les CCLII protonés à cause du passage de l'énergie de la chlorophylle à la violaxanthine. Cette catégorie ne fournit aucune émission de chaleur car elle engage toute son énergie dans les liaisons des CCLII avec les caroténoïdes ainsi que dans les réactions enzymatiques proprement dites.

3- Les CCLII associés aux zéaxanthines et qui possèdent les mêmes caractéristiques que le type précédent.

Ainsi, en découvrant le fait très important que le cycle des xanthophylles n'est accompagné d'aucune variation thermique bien qu'il augmente le degré du quenching de fluorescence d'un facteur d'environ 3, le concept physiologique du cycle des xanthophylles jusqu'à présent inconnu devient clair. Les plantes, pour minimiser l'effet de l'excès de la lumière, engagent une grande partie de l'énergie sous forme de séries d'association et de dissociation des xanthophylles, et qui se traduisent par un quenching non photochimique énergie-dépendant de la fluorescence.

Ce résultat fascinant ne peut pas être dégagé de la mesure de fluorescence seule car jusqu'à présent, aucune méthode de calcul de celle-ci n'a pu différencier entre le q_E provoqué exclusivement par la formation du ΔpH et le q_E amplifié par le cycle des xanthophylles. Toutefois, grâce à la spectroscopie photoacoustique, nous avons pu mettre en évidence que la séparation entre ces deux types du quenching énergie-dépendant est possible et tout à fait différenciable.

La seconde variation que l'on observe dans le tracé de fluorescence suite à l'addition de l'ascorbate, et qui est par contre très visible dans le tracé photoacoustique, est d'ordre photochimique. L'analyse de l'effet de l'ascorbate sur la chaîne du transport d'électrons devrait nous fournir l'explication de cette variation. L'analyse des tracés de fluorescence et photoacoustique démontre que la présence de l'ascorbate induit une diminution des valeurs du quenching photochimique. Après le premier pulse, le niveau stationnaire de la photosynthèse (F_V), atteint après l'illumination, indique qu'une partie des Q_A reste à l'état réduit. Ceci montre que le recouvrement de la relaxation de Q_A^- dans l'obscurité est incomplet. La figure 26 montre que cette diminution de la quantité des Q_A actives est proportionnelle à la concentration de l'ascorbate. La combinaison de ces deux résultats montre que l'ascorbate est inévitablement impliqué dans la formation de la photoinhibition observée.

La photoinhibition de la membrane du thylacoïde peut avoir deux origines; soit elle est due à l'inactivation du côté donneur, soit à celle du côté accepteur. La distinction entre ces deux formes de photoinhibition est un concept relativement nouveau. Pour la compréhension de ces modes de photoinhibition, deux modèles distincts qui proposent tous les deux l'implication critique des radicaux ont été proposés.

Un premier modèle, qui considère surtout les réactions séquentielles conduisant à l'oxydation de l'eau, traite des dommages que peut subir le PSII et qui sont préalablement dus aux radicaux hautement oxydants Y_Z^+ ou $P680^+$. L'accumulation de ces radicaux dangereux peut provoquer l'oxydation des chromophores ou des résidus voisins telles les protéines D1 et D2, ce qui mène à leur dégradation. A travers ce schéma, Thompson et Brudvig (1988) ont proposé que c'est le Cyt b-559 qui joue le rôle principal dans l'élimination de ces radicaux. En effet, le complexe du Cyt b-559 peut se trouver sous deux formes rédox interconvertibles, une à haut potentiel (+400 mV) et l'autre à faible potentiel (+60 à +80 mV) (Barber et De Las Rivas, 1993). Dans sa forme à haut potentiel, le Cyt b-559 est maintenu réduit par $PhéO^-$, il est donc idéal pour donner les électrons à $P680^+$ qui retourne à son état fondamental. Le Cyt b-559 fourni donc un chemin plus sécuritaire pour les électrons dans le PSII en réduisant les radicaux cationiques endommageants.

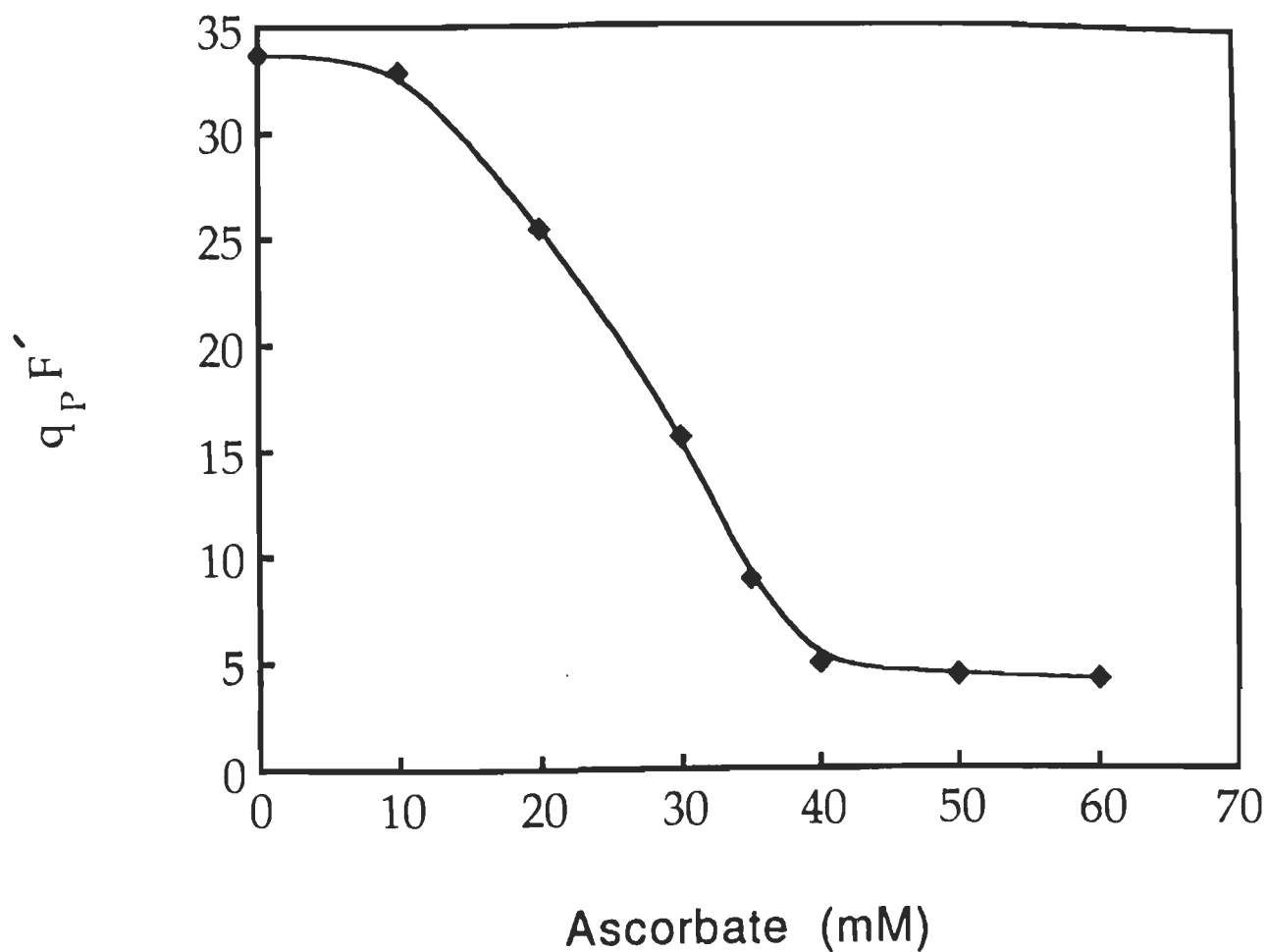


Figure 26 : Effet de la concentration d'ascorbate sur le quenching photochimique de fluorescence chez les thylacoïdes. Les valeurs des quenchings sont des moyennes de 5 mesures prises au 25^{ème} pulse et sont représentées en pourcentages de l'émissions de fluorescence. l'expérience est menée à la température de la pièce.

Le modèle alternatif proposé pour le rôle des radicaux dans la photoinhibition considère plutôt les radicaux anioniques réducteurs formés dans la séquence conduisant à la réduction de la plastoquinone. Dans ce modèle, la cible de la photoinhibition est la création de Phéo^- stable qui se produit quand Q_A est réduite, et qui conduit à l'état $(\text{P680}^+\text{Phéo}^-\text{Q}_\text{A}^-)$. Quoique cet état est typiquement renversé par une réaction de recombinaison entre P680^+ et Phéo^- , une faible probabilité pour que le premier donneur P680^+ puisse être réduit par YZ persiste. Cette situation crée l'état stable $\text{P680 Phéo}^-\text{Q}_\text{A}^-$, et comme Phéo^- est un puissant réducteur, il peut réduire doublement Q_A . La double réduction des Q_A provoque la perte de ces quinones et la dégradation de la protéine D1. Consistant avec ce dernier modèle, il a été proposé par Nedbal et al. (1992) qu'il existe un élément rédox qui peut accepter les électrons à partir de Phéo^- . Cette alternative, qui devrait empêcher la formation de Q_A^{2-} par l'oxydation de Phéo^- , représente donc un moyen de protection de la photoinhibition d'un facteur d'au moins 15. Cet élément a été identifié comme étant le Cyt b-559 qui peut être réduit par des médiateurs externes, dont l'ascorbate (Barber et De Las Rivas, 1993).

Ne considérant maintenant que le cas où 60 mM d'ascorbate ont été ajoutés, le Cyt b-559 se trouve largement réduit. Cette surréduction devrait bloquer toute donation d'électrons à partir de Phéo^- au Cyt b-559. Q_A^- représente alors le seul accepteur des électrons fournis par Phéo^- . La recombinaison alternative de Phéo^- avec P680^+ s'avère plutôt limitée par la réduction de ce dernier soit par YZ , soit par le Cyt b-559 lui même réduit. Le résultat de la formation de Q_A^{2-} se répercute sur sa vitesse de relaxation dans l'obscurité. Ainsi, comme le Cyt b-559 reste réduit par l'ascorbate, il ne peut pas accepter les électrons de Q_A^{2-} . D'autre part, le Cyt b-559 entre en compétition avec ces mêmes Q_A^{2-} pour la donation des électrons à la plastoquinone, qui représente l'accepteur immédiat pour les deux formes réduites. Le fait qu'une partie des plastoquinones soit engagée dans l'oxydation du Cyt b-559 contribue à la diminution de la réoxydation des Q_A^- . La limitation des accepteurs des électrons pour Q_A^- , qui résulte donc de la présence de l'ascorbate, augmente la quantité des Q_A inactives et quenche photochimiquement la fluorescence et l'émission thermique.

Malgré la cascade de cheminements que peuvent suivre les produits de l'utilisation du transport des électrons, à savoir l'oxygène et les protons, et la diversification des moyens de la dissipation de l'excès de l'énergie, les plantes ne peuvent pas empêcher totalement la formation d'espèces toxiques de l'oxygène, superoxyde et dérivés. Elles se voient alors obligées de mettre en œuvre d'autres mécanismes de protection capables d'inhiber ces espèces formées. Ces antioxydants incluent des systèmes enzymatiques telles les catalases, les superoxydes réductases, les caroténoïdes dont on cite en particulier les zéaxanthines et l'acide ascorbique.

La capacité de l'ascorbate a refouler le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été attribuée à l'activité de l'ascorbate peroxydase (fig 27). Cet enzyme se trouve présent aussi bien sous forme liée au thylacoïde qu'en solution dans le stroma (Fig. 27). L'oxydation de l'ascorbate par l'ascorbate peroxydase produit le monohydroascorbate (MDA) à partir de H_2O_2 et O_2^- (Miyake et Asada, 1992). Le MDA a été identifié comme un accepteur d'électrons entrant en compétition avec $NADP^+$ au niveau du PSI. Il participe donc, en plus de l'élimination des dérivés toxiques de l'eau, à la protection contre la photoinhibition (Forti et Ehrenheim, 1993).

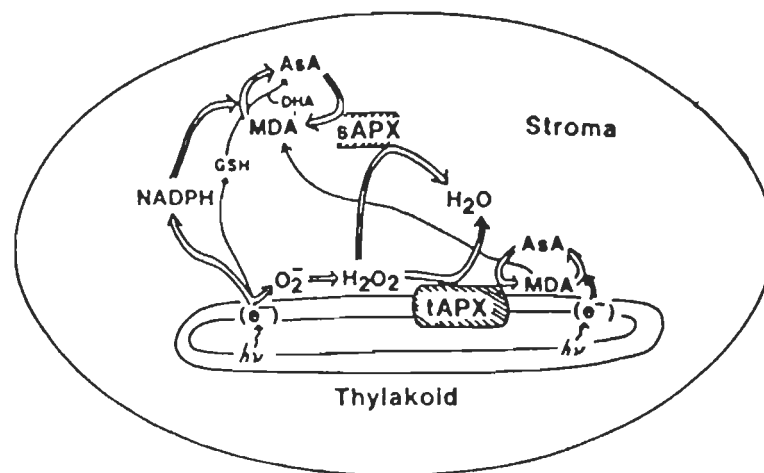


Figure 27 : Schéma représentatif de l'emplacement et du rôle de l'ascorbate peroxydase dans la membrane photosynthétique.

3. 2. 3. 5. Effet du FCCP

Le carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP), est connu plus généralement comme un protonophore membranaire. C'est un découpleur classique utilisé le plus souvent pour induire une diminution du ΔpH . Cependant, il peut aussi agir comme inhibiteur de la photosynthèse en affectant le complexe de dégagement d'oxygène.

Considérant ces deux modes d'action, qui peuvent tous les deux affecter l'émission de fluorescence, nous nous sommes proposés d'inspecter dans cette section l'effet du FCCP sur les tracés d'émission de la fluorescence et de la photoacoustique pris simultanément sur un même échantillon. La figure 28 montre les variations induites par FCCP sur les dits tracés. On peut constater tout de suite une forte augmentation du quenching non photochimique de fluorescence, accompagnée par une augmentation aussi marquée de l'émission thermique.

Ce résultat, tout à fait contradictoire aux effets des découpleurs nous a incité à considérer l'autre possibilité du mode d'action, et qui consiste en l'inhibition du dégagement d'oxygène. L'analyse de nos tracés nous a montré, qu'en fonction du temps et parallèlement aux variations non photochimiques, il se produit une forte inhibition de la fluorescence variable et de l'emménagement de l'énergie photosynthétique. D'après la littérature, cette réaction est appelée l'effet ADRY (pour Acceleration of deactivation Reaction of water-splitting enzyme Y). Comme son nom l'indique, l'effet ADRY est une réaction d'inhibition du complexe de dégagement d'oxygène dont l'un des agents est le FCCP.

Aux très faibles concentrations (10^{-6} M), FCCP inhibe la formation d'ATP avec une stimulation concomitante du taux du transport des électrons (Rashid et al., 1987). Toutefois, à des concentrations plus élevées, FCCP est capable de ralentir la donation des électrons au $P680^+$ (Rashid et Carpentier, 1991). L'interaction du FCCP avec le côté donneur du PSII provoque donc une baisse importante des niveaux stationnaires de la fluorescence variable (F_v) induits par le faisceau de mesure modulé.

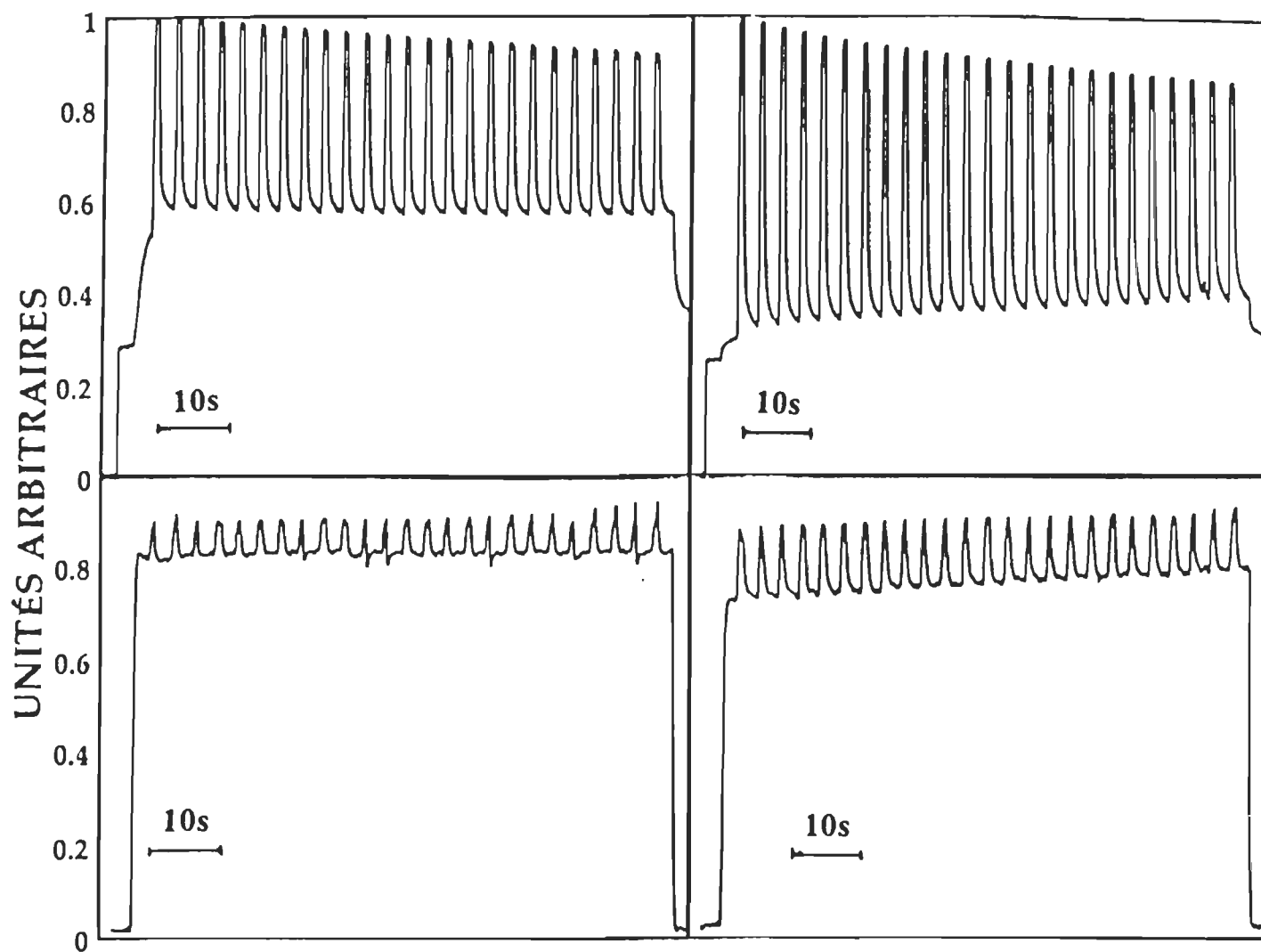


Figure 28 : Tracés représentatifs des émissions de fluorescence et thermique dans les membranes thylacoïdiennes, avant (côté gauche) et après (côté droit) addition de 4 μM FCCP afin d'inactiver le complexe d'oxydation de l'eau. Les émissions de fluorescence et thermique sont représentées en unités arbitraires. Les pulses sont de 1 s et les périodes obscures de 2 s chacune. La constante de temps de l'appareil est de 30 ms. La mesure est à la température de la pièce.

L'application par la suite de la lumière actinique saturante augmente, d'une façon remarquable les niveaux de saturation de la fluorescence. Cette augmentation nous permet d'avoir des valeurs de qpF de près de 90 %, ce qui représente une augmentation d'environ 60 % par rapport au contrôle. Cette augmentation de qp est obtenue par une activation du flux des électrons du complexe de dégagement d'oxygène au $P680^+$. L'augmentation de qpF' obtenue dans le cas du FCCP a été déjà rapportée par Schreiber et Neubauer (1987) suite à l'addition de l'agent de l'effet ADRY.

En représentant les valeurs des quenchings thermiques et de fluorescence en fonction des pulses, respectivement pour les échantillons contrôles et les échantillons traités (fig. 29), nous remarquons une baisse remarquable de qpF jumelée à une baisse parallèle de qpQ' en présence du FCCP. Ce résultat peut être expliqué par l'augmentation progressive de la photoinhibition qui accompagne l'inhibition du dégagement d'oxygène (Björkman, 1987; Demmig et Björkman, 1987, Somersalo et Krause, 1990).

L'application de tout effet inhibiteur au transfert des électrons dans la membrane photosynthétique provoque l'activation de divers mécanismes de protection. Un des mécanismes le plus adopté par les plantes est l'augmentation de la dissipation thermique via l'induction du quenching non photochimique de photoinhibition q_I . Cette idée est généralement acceptée dans le cas des agents ADRY dont la présence ne provoque aucune augmentation de ΔpH . En outre, il a été aussi rapporté dans le cas de l'utilisation du FCCP qu'une production de H_2O_2 peut avoir lieu. En présence de ce dérivé toxique, qui sert ici comme donneur d'électrons à la place de l'eau (Rashid et Carpentier, 1991), la donation des électrons au $P680^+$ peut être accélérée. Cette réaction aura comme effet d'augmenter le quenching photochimique. Cependant, divers travaux sur le peroxyde d'hydrogène indiquent son implication dans les processus de photoinhibition du PSII. Dans ce cas là aussi, une augmentation de q_I au dépend de q_E va se produire, et elle résulterait de l'augmentation du quenching non photochimique de la fluorescence et en l'augmentation de la désactivation thermique.

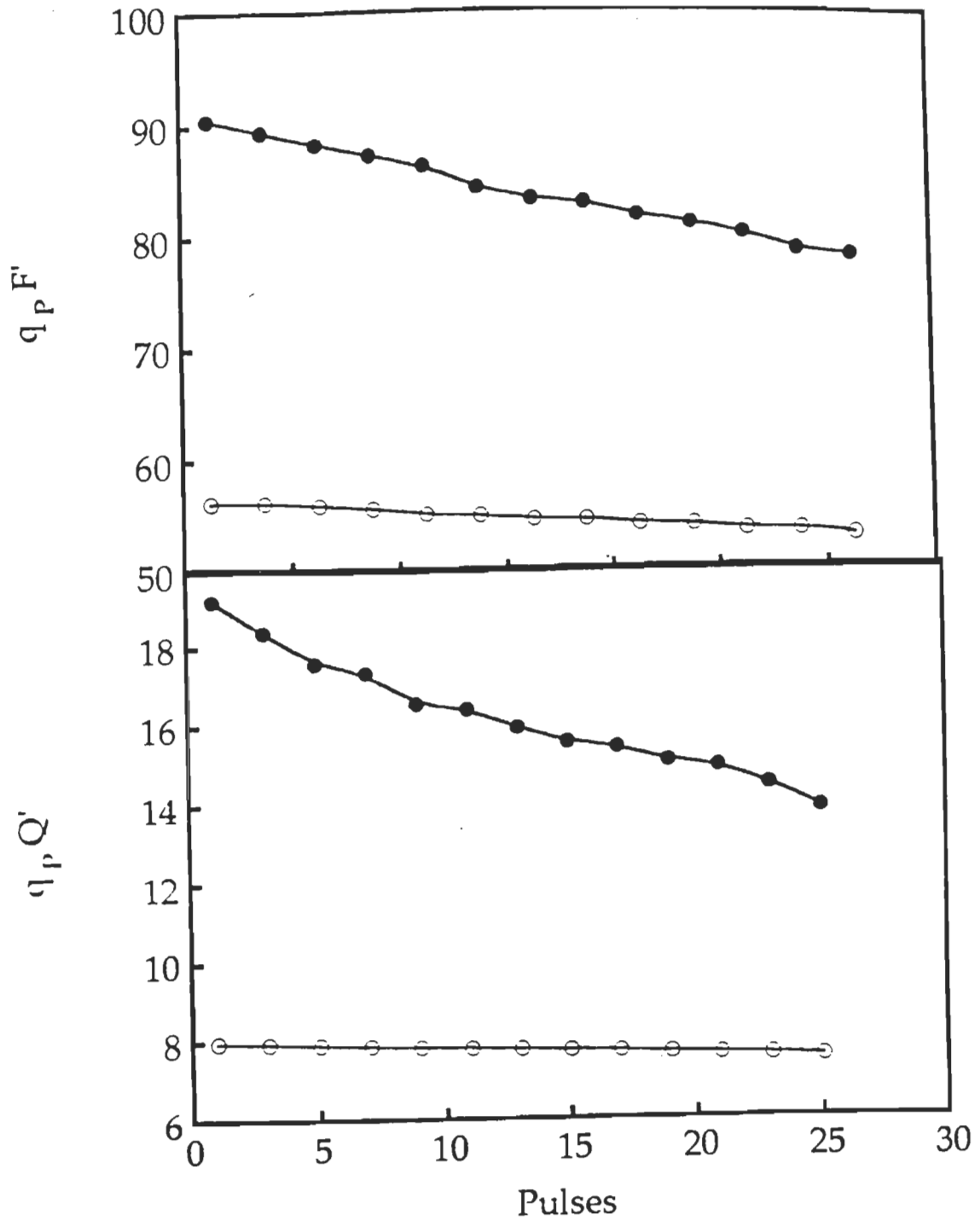


Figure 29: Courbes représentatives des quenchings photochimiques de fluorescence (figure du haut) et thermique (figure du bas), en fonction du nombre de pulses chez les thylacoïdes, en absence (o) et en présence (●) de 4 μM FCCP. Un pulse représente 2 s d'illumination saturante suivis de 3 s d'obscurité. Le temps total de l'expérimentation est 128 s. $q_P F'$ et $q_P Q'$ sont en pourcentages des émissions totales de fluorescence et photoacoustique respectivement. La constante du temps de l'appareil est 30 ms. La mesure est à la température de la pièce. Les valeurs sont des moyennes de 5 mesures répétées 3 fois.

Dans la figure 30, les valeurs du quenching non-photochimique de l'émission de fluorescence et de la désactivation thermique sont présentés en fonction du nombre de pulses. Les résultats que nous avons trouvé dans cette section montrent que le quenching de fluorescence passe de 8% à près de 20%. C'est une augmentation remarquable est accompagnée par une augmentation de l'émission thermique de 1.4% à environ 2.5%. Si nous représentons ces résultats en fonction de l'énergie totale absorbée, nous verrons qu'il se oproduit en effet une augmentation du quenching non-photochimique de la fluorescence dont la valeur passe à 0.6%, ainsi q'une augmentation de l'émission thermique qui représente alors plus de 2.4% de l'énergie totale.

Ainsi, nous pouvons noter qu'il se produit une augmentation de près 2.5 fois pour chacun des deux quenchings, thermique et de fluorescence. Ce résultat est tout à fait différent du cas des quenchings non photochimiques énergie-dépendants étudiés dans les sections précédentes. Ainsi, nous sommes donc en mesure d'éliminer la participation de la photoinhibition dans les quenchings non photochimiques observés dans le cas de l'utilisariion des découpleurs et des inhibiteurs, et surtout dans le cas de l'utilisation de l'ascorbate.

Dans ce cas aussi, pour s'assurer que la proprtionnalité qui existe entre l'émission de fluorescence et la désactivation thermique est valable en tout temps de l'expérimentation, nous avons vérifié la corrélation entre les deux tracé. La figure 31 illustre ce résultat et montre, que de la même façon que pour les corrélations précédentes, il existe une parfaite linéarité entre les deux cinétiques. Ce résultat peut nous apporter la confirmation de la stabilité dela régulation de l'émission thermique qui peut être aussi contrôlée, en plus de la dissipation non photochimique énergie-dépendante, par une désactivation due aux phénomènes d'atténuation, toujours non photochimique, mais dus à la photoinhibition. L'utilisation du FCCP confirme aussi le fait que dans le cas où la régulation non photochimique énergie-dépendante n'est plus efficace, c'est le quenching non photochimique de photoinhibition qui prend la relève et assure alors la dissipation de l'excès d'énergie absorbée.

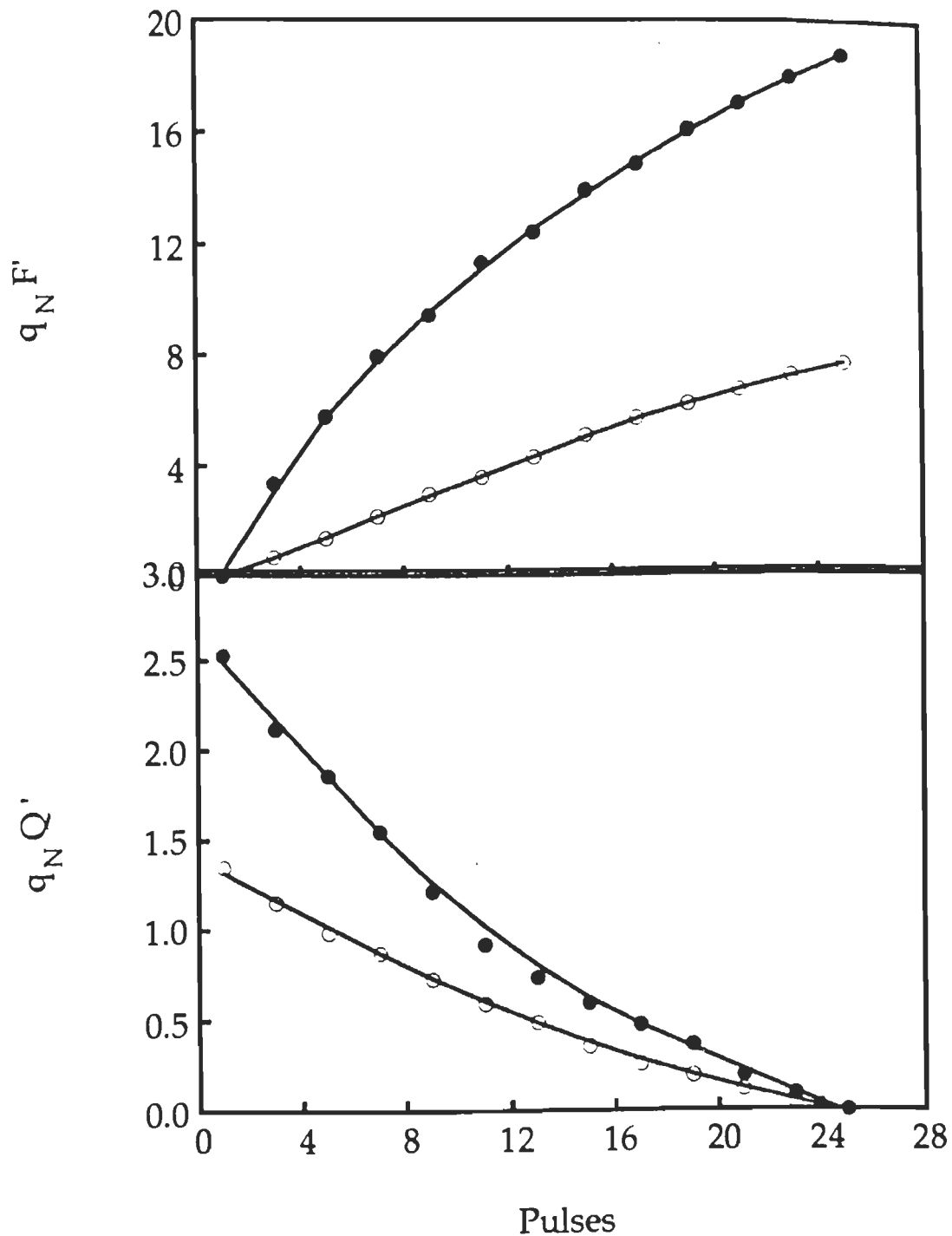


Figure 30 : Courbes représentatives des quenchings non-photochimiques de fluorescence (figure du haut) et thermique (figure du bas), en fonction du nombre de pulses chez les thylacoïdes, en absence (o) et en présence (●) de 4 μ M FCCP. Un pulse représente 2 s d'illumination saturante suivis de 3 s d'obscurité. Le temps total de l'expérimentation est 128 s. $q_{NF'}$ et $q_{NQ'}$ sont en pourcentages des émissions totales de fluorescence et photoacoustique respectivement. La constante du temps de l'appareil est 30 ms. La mesure est à la température de la pièce. Les valeurs sont des moyennes de 5 mesures répétées 3 fois.

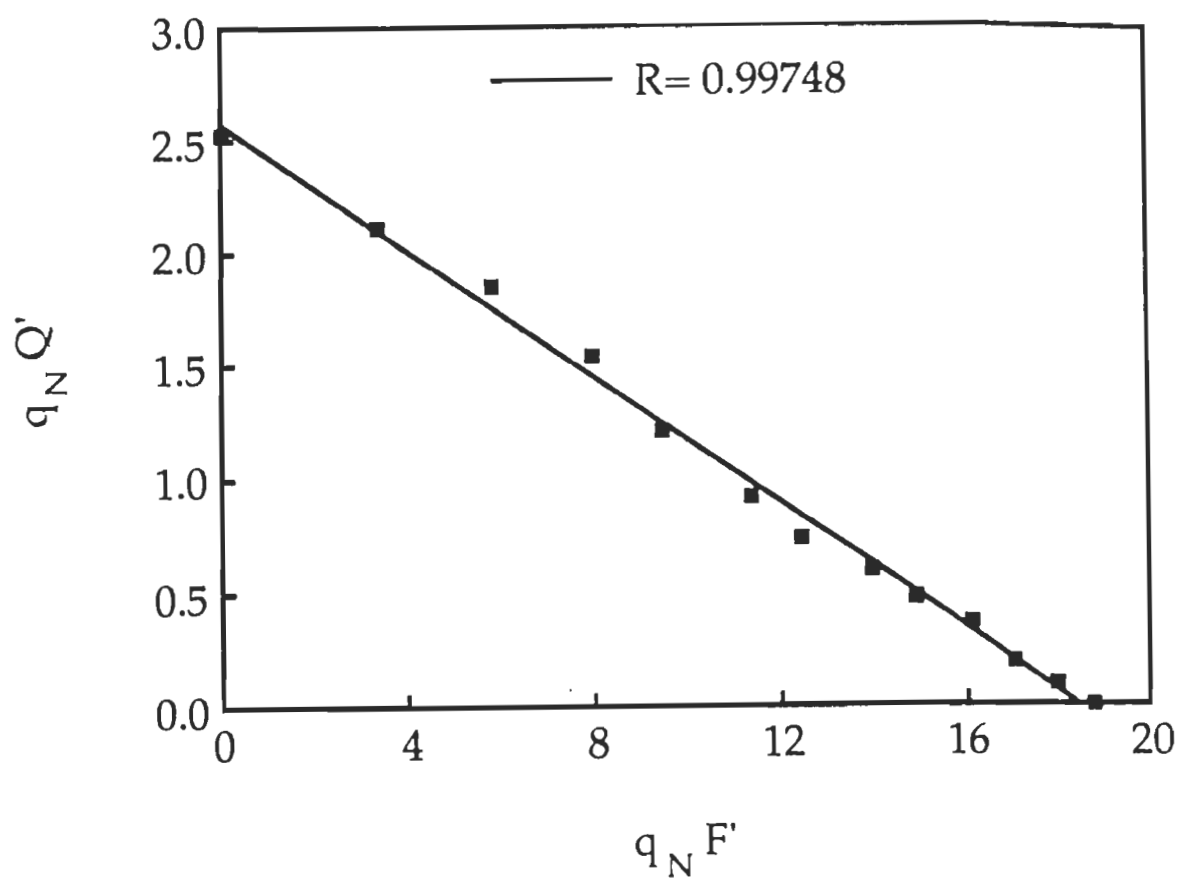


Figure 31 : Courbe de corrélation entre le quenching non photochimique de fluorescence $q_N F'$ et le quenching non photochimique thermique $q_N Q'$ en présence de 4 μM FCCP.

3. 2. 4. Conclusion

Dans cette première partie de notre discussion, et qui concerne le quenching non photochimique de l'émission thermique variable, nous avons traité de tous les aspects physiologiques de la régulation de l'excès de lumière absorbé.

Nous pouvons conclure, comparativement aux émissions de fluorescence, que le quenching non photochimique énergie-dépendant de fluorescence, du exclusivement à la formation d'un gradient électrochimique de protons est accompagné par une augmentation concomitante et proportionnelle de l'émission thermique. Cette régulation est aussi bien valable pour le quenching énergie-dépendant formé principalement par l'augmentation de l'acidité du compartiment intrathylacoïdien (le cas des découpleurs et inhibiteurs), que le quenching formé par une augmentation de la photoinhibition (le cas du FCCP).

L'utilisation d'agents capables d'induire une variation de l'acidité luminale, et qui ne représente pourtant aucun effet sur l'énergisation de la membrane, tels la procaine et DCCD, nous a révélé que le quenching non photochimique, que ce soit de la fluorescence ou de l'émission thermique, est exclusivement contrôlé par le changement du pH luminal et non par le changement du gradient électrochimique du proton comme l'indique le nom même du quenching énergie-dépendant.

Dans la suite de notre travail, nous avons pu confirmer davantage les résultats présentés ci-haut. En effet, l'utilisation de l'ascorbate, qui est connu généralement pour être un amplificateur de l'effet du ΔpH dans la formation de q_NF , s'est révélée d'une importance capitale dans cette étude. Le fait le plus fascinant qu'on a pu déduire est que le quenching non-photochimique induit par l'activation du cycle des xanthophylles ne se traduit par aucune variation thermique par rapport au contrôle. Ce résultat est le premier de son genre qui sépare l'augmentation du quenching non photochimique de l'émission de fluorescence qui est due à l'acidité du lumen de celui due à la participation d'autres agents tel le cycle des xanthophylles, et ce grâce à la spectroscopie photoacoustique.

Ce dernier résultat vient rejoindre un grand nombre d'études menées les deux dernières années et qui se rapprochaient de plus en plus du mécanisme exact du quenching non-photochimique. Ainsi, notre contribution dans ce domaine combien discuté, se résume en la caractérisation du rôle de l'émission thermique dans la régulation de l'énergisation de la membrane, ainsi que sa participation dans la régulation du quenching non-photochimique énergie-dépendant de la fluorescence.

Cette contribution ne représente pas seulement une raison d'être de la spectroscopie photoacoustique qui a été depuis toujours considérée comme méthodologie ne reflétant que les variations de la fluorescence, mais elle nous a aussi permis de déterminer avec plus de précision quelques aspects énigmatiques de la régulation du quenching énergie-dépendant de la fluorescence, comme l'effet de l'antimycine A, la relation de l'émission thermique avec l'agrégation des CCLII, et le rôle physiologique du cycle des xanthophylles.

3.3. RÉGULATION PHOTOCHEMIQUE DE L'ÉMISSION THERMIQUE

La lumière étant le substrat principal de la photosynthèse, est indispensable à la croissance autotrophe des organismes photosynthétiques. Toutefois, elle est un substrat insaisissable qui n'est pas facilement géré au niveau moléculaire, et qui peut donc être nocif à l'appareil photosynthétique.

Actuellement, il y a un consensus général qui confirme que la cible principale du stress lumineux est le PSII (Powles et al., 1984). Ce stress conduit inévitablement à une altération du transport d'électrons à travers la membrane du thylacoïde (Kyle et al., 1984), et un endommagement irréversible des sous-unités du centre réactionnel du PSII, en particulier la protéine D1 (Mattoo et al., 1989). Cette suite de réactions est connue sous le nom de la photoinhibition (Kyle et al., 1984).

Comme j'ai déjà indiqué dans l'introduction, la photoinhibition peut avoir deux cibles différentes dans le photosystème II, soit le côté donneur par inhibition de la réaction d'oxydation de l'eau (Jegerschöld et al., 1990), soit le côté accepteur par la surréduction des quinones acceptrices d'électrons (Andersson et al., 1992). La différenciation entre ces deux modes de photoinhibition est un concept relativement nouveau et, du point de vue émission de fluorescence, de même que pour la désactivation thermique, c'est plutôt la réduction du côté accepteur du PSII qui est le plus souvent discutée.

Dans cette section, qui traitera spécialement du quenching photochimique, il ne sera pas question d'étudier l'effet de la photoinhibition sur les rendements de fluorescence et l'emmagasinement de l'énergie photosynthétique. Ces effets sont généralement connus et ils ont été étudiés dans divers travaux. Dans notre étude, nous nous limiterons à utiliser la photoinhibition comme moyen de quantification de la variation du quenching photochimique afin de dégager les relations étroites qui existent entre l'émission thermique et l'émission de fluorescence d'une part, et de mieux caractériser les composantes membranaires impliquées dans l'emmagasinement de l'énergie photosynthétique mesuré par la SPA.

3. 3. 1. Effet de la photoinhibition sur les membranes thylacoïdiennes

La mesure de l'activité photosynthétique dans les thylacoïdes se fait généralement par la détermination du dégagement d'O₂. Ce paramètre est représenté par le nombre de micromoles d'oxygène dégagées par heure par mg de chlorophylle. Cette mesure a été souvent référée à l'activité du transport d'électrons photosynthétique (Krause et al., 1990). Dans notre étude, afin de déterminer une base de référence pour les émissions simultanées de la fluorescence et de la désactivation thermique, le taux de dégagement d'O₂ a été déterminé pour chaque durée de photoinhibition. Ainsi, nous avons pu établir une courbe standard pour l'effet de la photoinhibition nous permettant d'évaluer le degré d'altération de la membrane et d'avoir un moyen de comparaison entre les différents échantillons. Cette précaution nous a aussi permis de nous assurer de l'extraction complète des protéines extrinsèques du dégagement d'O₂ et de Mn de nos échantillons.

La figure 32 montre une diminution progressive du taux de dégagement d'oxygène en fonction du temps du traitement photoinhibiteur. Si l'on considère que l'échantillon non photoinhibé représente le maximum d'activité photosynthétique, soit 100 %, la perte totale de l'activité du transport d'électrons se produit à environ 10 min de photoinhibition dans les conditions utilisées. Cette diminution reflète le taux de transport des électrons à travers la membrane suite à la saturation des accepteurs primaires des électrons, soient les quinones QA et QB.

Diverses études ont mentionné que la photoinhibition de l'activité photosynthétique dans les systèmes membranaires provoque une diminution concomitante du taux de fluorescence (Cleland et Critchey, 1985). Il a aussi été rapporté que cette photoinhibition se traduit par une nette décroissance du taux d'emmagasiner de l'énergie photosynthétique (EEP) mesuré par spectroscopie photoacoustique. La variation du EEP, comme pour l'émission de la fluorescence, a été attribuée au taux de réduction des plastoquinones dans le transport linéaire des électrons (Carpentier et al., 1991). Ainsi, il est relié principalement au PSII en jugeant de sa grande similarité avec la fluorescence.

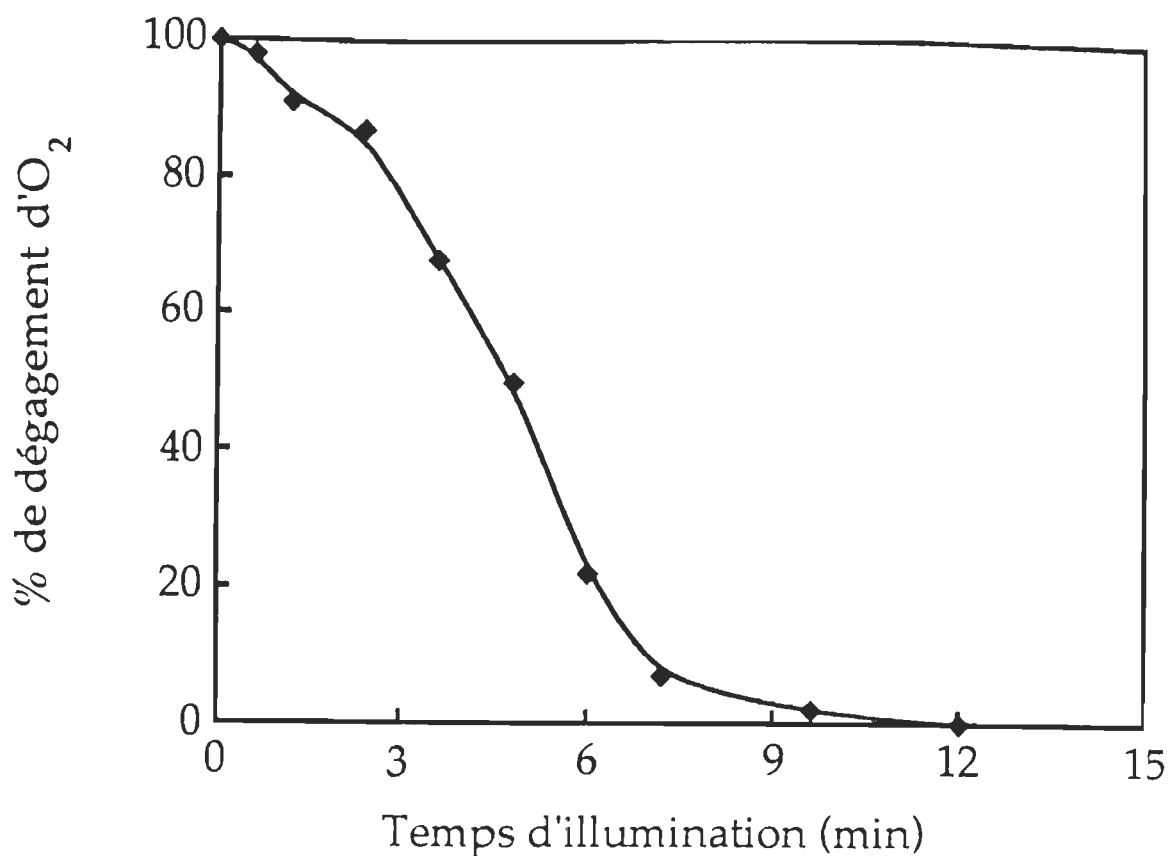


Figure 32 : Taux de dégagement d'oxygène dans les membranes thylacoïdiennes en fonction du temps de photoinhibition. Le contrôle, qui correspond à 100% de dégagement d'oxygène, est d'environ 150 mmol O₂/mg Chl x h à 22 °C. La source lumineuse est ajustée à 350 mWcm⁻². La photoinhibition a été réalisée à 4 °C. Les valeurs représentent des moyennes de 5 mesures différentes.

Comme notre étude vise à déterminer les relations étroites qui relient l'émission de fluorescence et la désactivation thermique dans les membranes photosynthétiques, nous allons étudier la variation simultanée que subissent ces deux émissions en fonction de la photoinhibition. Les échantillons ont été préparés selon les conditions mentionnées dans le chapitre II et introduits immédiatement dans la cellule photoacoustique. Les quenchings photochimiques simultanés que l'on a obtenu pour les différents échantillons ont été calculés selon les équations présentées en détail dans la section 3.1. Pour la fluorescence, nous allons donc prendre qPF' (eq 17) et, pour la photoacoustique qPQ' (eq 18). A noter que ce dernier terme correspond parfaitement au terme de l'emmagasinement de l'énergie photosynthétique et donc peut le remplacer.

D'après la courbe présenté dans la figure 33, nous pouvons constater une diminution progressive concomitante des valeurs des quenchings photochimiques de la fluorescence et thermique. Au début de la progression, les deux courbes présentent la même cinétique. Toutefois, au bout de quelques minutes, ces cinétiques commencent à présenter des différences. L'analyse de ces courbes nous montre qu'après 10 minutes d'illumination, le quenching thermique devient plus lent, ce qui suggère qu'il existe des éléments dans la membrane qui sont moins sensibles à la photoinhibition que le taux de réduction des plastoquinones. Ce résultat devient plus évident si l'on considère les valeurs présentées sur les courbes à 15 min environ. A ce niveau, toute la fluorescence variable se trouve éliminée alors que du côté thermique il reste encore une grande partie qui semble être plus résistante au traitement photoinhibiteur et dont la cinétique semble se stabiliser largement.

Afin de déterminer plus précisément la quantité de cette portion de l'émission thermique qui persiste après l'élimination de la fluorescence variable, nous avons présenté les valeurs du quenching photochimique thermique en fonction des valeurs équivalentes du quenching de fluorescence. La figure 34 nous illustre ce résultat et montre que la relation entre ces deux émissions est parfaitement linéaire. La valeur de l'émission thermique qui correspond au maximum de quenching de fluorescence est de 26%.

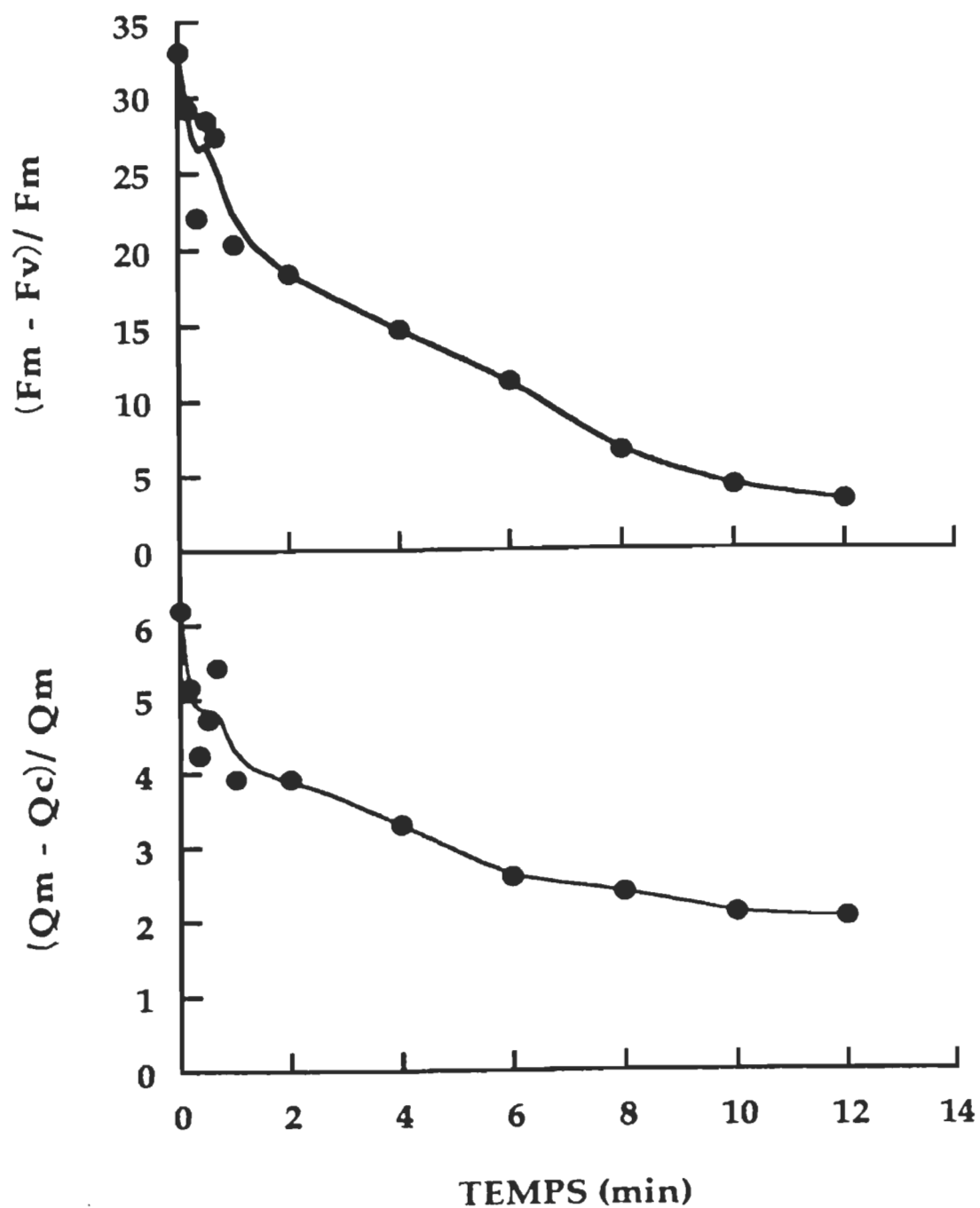


Figure 33 : Courbes représentatives des quenchings photochimiques de fluorescence (figure du haut) et thermique (figure du bas) en fonction du temps de photoinhibition chez les thylacoïdes. les valeurs des quenchings sont en pourcentages des émissions de fluorescence pour $F_m - F_v / F_m$ et thermique pour $Q_m - Q_c / Q_m$. Tous les points représentent la moyenne de 5 mesures différentes prises à la température de la pièce et après un seul pulse de 6 s.

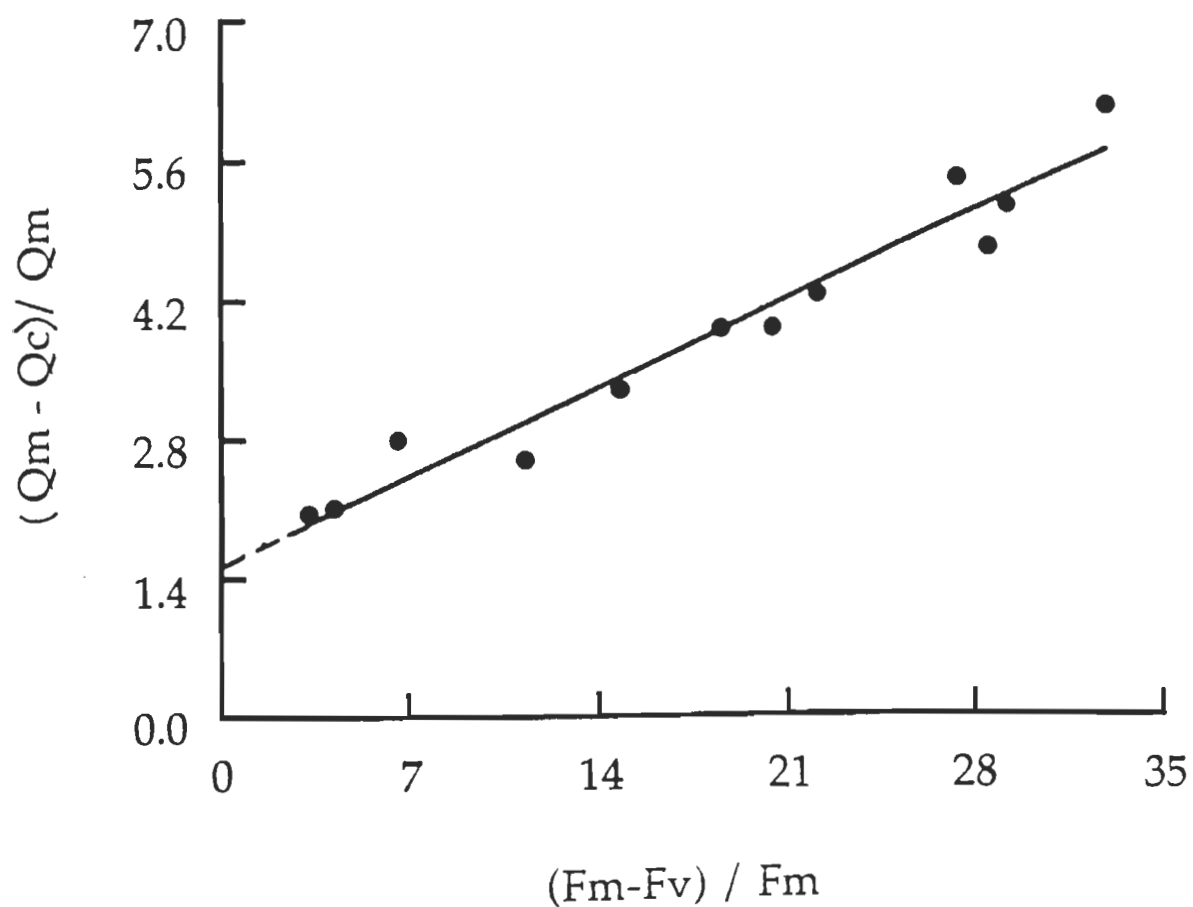


Figure 34 : Courbe de corrélation entre les quenchings simultanés de l'émission thermique et de l'émission de fluorescence dans les membranes thylacoïdiennes. Les valeurs sont représentées en pourcentages des émissions de fluorescence et thermique. Les mesures ont été réalisées à la température de la pièce et la constante de temps de l'appareil est de 30 ms. La valeur de 1.6% du quenching de thermique représente 26% du quenching thermique total et correspond au point où toute la fluorescence variable a été éliminée.

Si nous comparons maintenant les deux courbes des quenchings photochimiques de fluorescence et thermique (Fig. 33), nous remarquons que les diminutions de F_v et Q_v sont plus lentes que celle du taux de dégagement d'oxygène (Fig. 32). L'explication de ce résultat a été donnée dans une étude récente menée par Lapointe et al en 1993. Ces auteurs suggèrent que la disparité entre le taux d'activité du PSII et les valeurs de F_v et Q_v est due à la participation d'unités PSII β dans la désactivation de la chlorophylle excitée. Ces unités semblent prendre la relève dans les processus photochimiques une fois que toutes les unités PSII α sont inactivées. Pour mieux comprendre cette hypothèse, nous allons présenter dans le prochain paragraphe un bref aperçu de l'hétérogénéité du PSII.

La membrane photosynthétique est un complexe membranaire très hétérogène, et son hétérogénéité ne se résume pas seulement à la diversité de ses constituants et à leur distribution latérale, mais elle s'étend aussi à la différenciation spatiale entre les unités actives et inactives d'un même constituant. Ainsi, il est connu que la population des PSII est formée de deux types principaux que l'on appelle PSII α et PSII β (Black et al., 1986). Ces deux sous-unités diffèrent sur plusieurs points, dont la taille des antennes, la capacité de réduire le pool de plastoquinones dans le site accepteur, d'où leurs noms d'unités PSII- Q_B réducteurs et PSII- Q_B non réducteurs, (Anderson et Melis, 1983), et finalement leur localisation spécifique dans la membrane; les PSII α se trouvent principalement dans les grana alors que les PSII β sont plutôt abondants dans les lamelles stromatiques.

Les estimations de la fraction des PSII β dans la membrane thylacoïdienne varient entre 15 et 40 % (Guenther and Melis, 1990). La variation observée dans leur pourcentage est considérée refléter un état intermédiaire de ces unités qui conduit à l'assemblage des unités PSII α . Les PSII β sont donc considérés comme un bassin de réserve pour la fraction des PSII actifs dans les grana (Neale et Melis, 1990; Guenther et Melis, 1990). Toutefois, pour agir comme une réserve pour les PSII α , le pool des PSII β doit être moins sensible à la photoinhibition en cas de forte luminosité, et c'est effectivement ce que proposent les études de Cleland et al. (1986) et Maenpää et al. (1987).

Toutefois, si nous analysons le pourcentage de la portion de l'énergie emmagasinée dégagée thermiquement alors que toute la fluorescence variable a été éliminée, nous constatons que cette proportion 26% dont la valeur est pratiquement identique à celle trouvée par Lapointe et al., ne peut être émise par les unités PSII β dont la proportion est très faible. Ainsi, la suggestion qui a été proposée par ces auteurs est que, suite au traitement photoinhibiteur, une nouvelle proportion de PSII β apparaît et qu'elle provient de la conversion des unités PSII α localisées dans les empilements granaires.

D'autre part, ces mêmes auteurs ont postulé que l'énergie photosynthétique, qui reste après l'élimination totale de l'activité du PSII, peut être emmagasinée dans le PSI. En effet, dans des études antérieures, il a été suggéré qu'après un traitement inhibiteur qui élimine totalement le dégagement d'O₂, les taux de diminution de l'EEP et l'activité du PSI deviennent similaires. Ce résultat pourrait nous suggérer que c'est la participation du PSI qui est responsable de la portion restante de qpQ' après l'élimination totale de la fluorescence variable. Toutefois, d'après Carpentier et al. (1990), chez les thylacoïdes dont le transport linéaire au PSI est bloqué par le DCMU, aucun PSI cyclique n'a pu être mesuré par le signal photoacoustique. Cet effet est probablement causé par l'absence de NADP⁺ dans les membranes thylacoïdiennes. L'O₂ devient alors l'accepteur final des électrons, mais ne peut induire un transport cyclique autour du PSI. Il reste toutefois possible que sous les conditions de photoinhibition, le PSI peut être affecté par la réduction de son affinité ou de sa disponibilité pour l'O₂, ce qui devrait alors faciliter le flux cyclique des électrons.

Afin de vérifier si l'hypothèse des PSII β , ou celle de la participation du PSI, sont valables pour expliquer la portion de l'énergie dégagée thermiquement après l'élimination totale de la fluorescence variable, nous avons étudié l'effet de la photoinhibition sur des membranes enrichies en particules de PSII et qui sont par conséquent dépourvus de PSI et d'unités PSII β principalement localisées dans les lamelles stromatiques.

3. 3. 2. Effet de la photoinhibition sur les PSII.

Pour pouvoir étudier l'effet de la photoinhibition sur les membranes enrichies en PSII, nous avons refait la même série de mesure citée dans le cas des thylacoïdes sur les PSII en absence de tout accepteur artificiel d'électrons.

L'effet du traitement photoinhibiteur sur l'activité du PSII, contrôlé par le taux de dégagement d'O₂, est plus marquée pour les PSII que pour les thylacoïdes, la figure 35 illustre ce résultat. En effet, le temps qui a été nécessaire pour l'élimination totale de l'activité photosynthétique n'est que de 6 min. Ce résultat est tout à fait concordant avec le fait que le PSII est plus sensible à la photoinhibition. De la même façon que pour le dégagement d'O₂, le PSII montre suite au traitement photoinhibiteur une rapide diminution des émissions de fluorescence et thermique variables. En analysant les cinétiques des quenchings photochimiques thermique et de fluorescence illustrées dans la figure 36, il s'avère qu'après 8 min de traitement, les cinétiques de diminution que présentent les émissions thermique et de fluorescence changent remarquablement. Ainsi qu'au bout de 10 min, toute la fluorescence variable disparaît alors qu'il persiste encore une bonne partie de l'émission thermique.

De la même façon que pour les thylacoïdes, la représentation des valeurs du quenching photochimique thermique en fonction des valeurs correspondantes du quenching de la fluorescence, illustrée dans la figure 37, montre que la portion restante dans le signal photoacoustique après l'élimination totale de la fluorescence variable, est de près de 20 %.

Ce résultat montre clairement que la portion de l'énergie emmagasinée après l'élimination totale de la fluorescence variable est pratiquement la même en présence et en absence du PSI et des unités PSII β des lamelles stomatiques. La petite différence de 6% provient probablement de variations dans la préparation des thylacoïdes et des membranes enrichies en particules de PSII. Ainsi, ce n'est ni le PSI, ni les unités PSII β qui sont responsables de la portion de l'énergie restante après l'élimination totale de la fluorescence variable et qui est dégagée thermiquement, vu qu'ils sont absents dans cette étude. Les éléments responsable de cet effet doivent donc se trouver dans les empilements granaires et sont probablement en relation avec les unités PSII α .

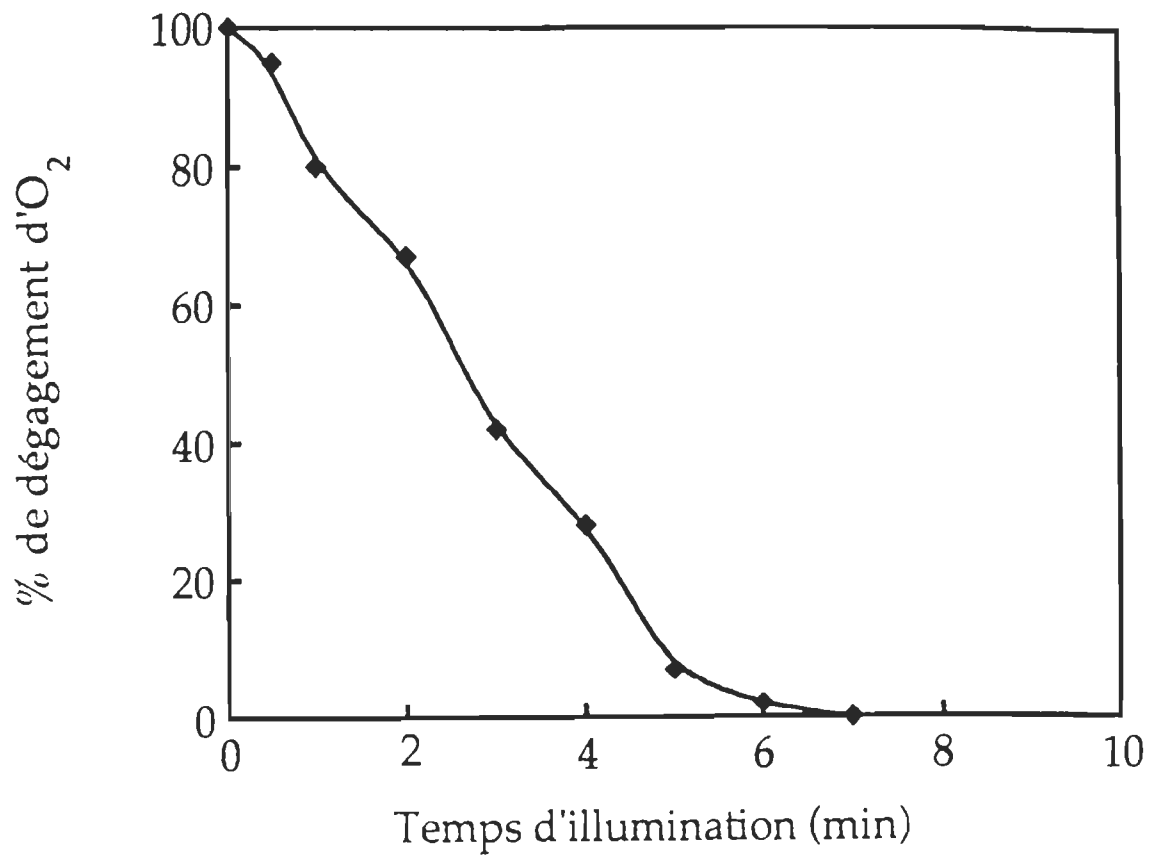


Figure 35 : Taux de dégagement d'oxygène dans les membranes enrichies en particules des PSII, en fonction du temps de photoinhibition. Le contrôle, qui correspond à 100% de dégagement d'oxygène, est d'environ 350 mmol O₂/mg Chl x h à 22 °C. La source lumineuse est ajustée à 350 mWcm⁻². La photoinhibition a été réalisée à 4 °C. Les valeurs représentent des moyennes de 5 mesures différentes.

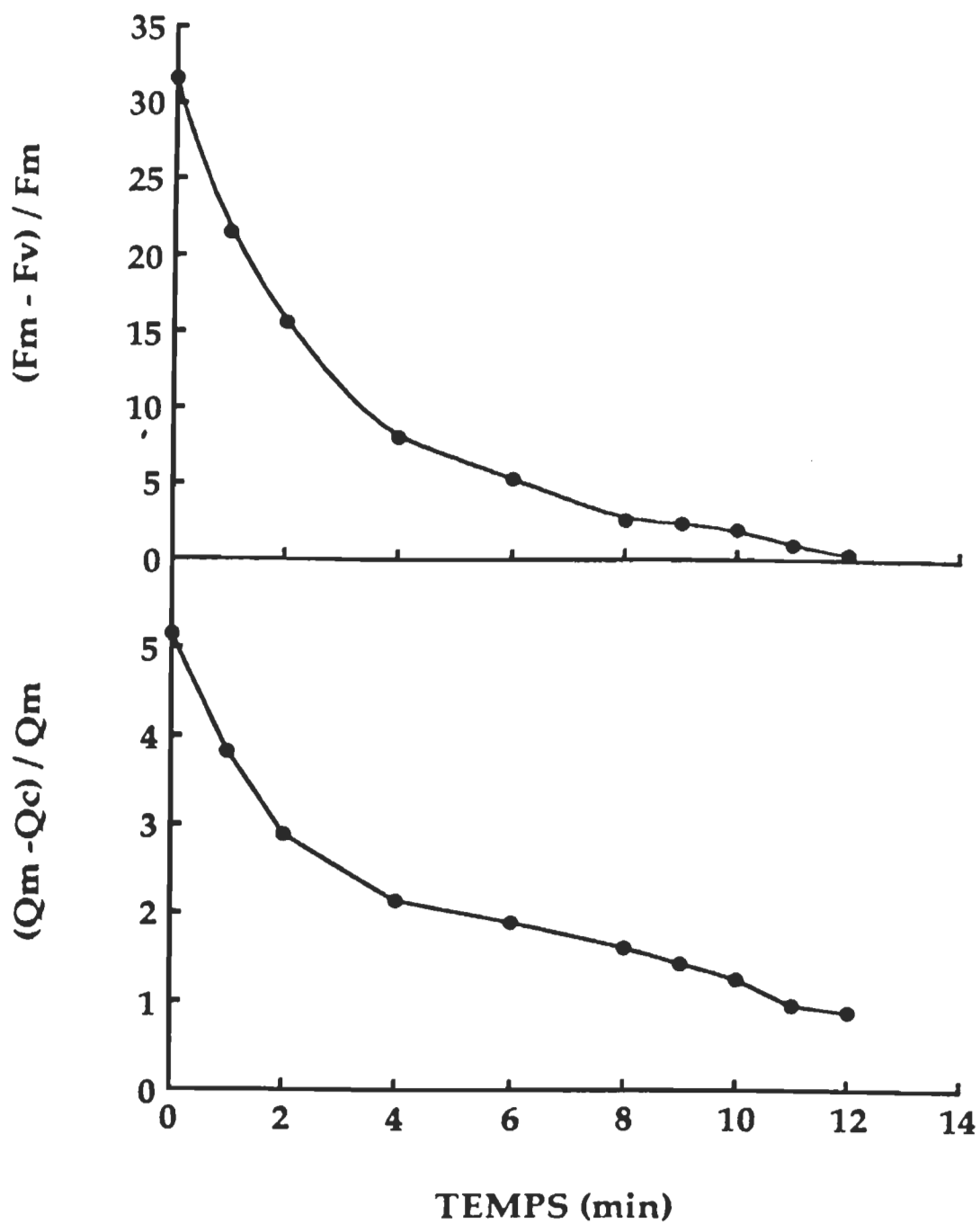


Figure 36 : Courbes représentatives des valeurs des quenchings photochimiques de fluorescence (figure du haut) et thermique (figure du bas) en fonction du temps de photoinhibition dans les particules des PSII. Les valeurs des quenchings sont en pourcentages des émissions de fluorescence pour $F_m - F_v / F_m$ et thermique pour $Q_m - Q_c / Q_m$. Tous les points représentent la moyenne de 5 mesures différentes.

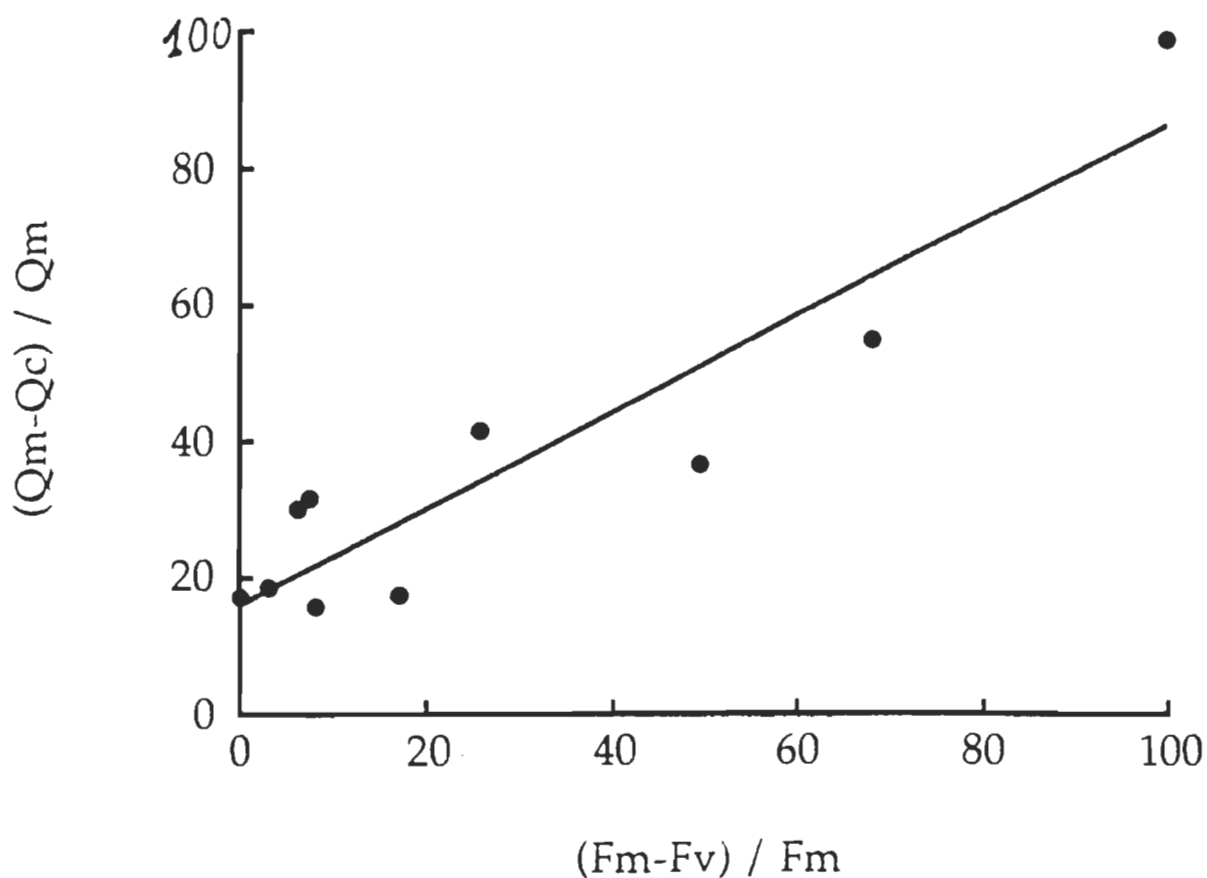


Figure 37 : Courbe de corrélation entre les quenchings simultanés de l'émission thermique et de l'émission de fluorescence dans les membranes enrichies en particules de PSII. Les valeurs sont représentées en pourcentages des émissions de fluorescence et thermique. Les mesures ont été réalisées à la température de la pièce et la constante de temps de l'appareil est de 30 ms. La valeur de 20% du quenching thermique total correspond au point où toute la fluorescence variable a été éliminée.

Dans le but d'éclaircir la supposition de la participation des PSII α dans l'emmagasinage de l'énergie photosynthétique quand toute la fluorescence variable est éliminée, nous avons considéré les résultats d'un travail tout récent portant sur l'étude de l'effet de la photoinhibition sur l'hétérogénéité du photosystème II. Ce travail, présenté par van Wijk et ses coéquipiers en 1993, postule que la conversion entre les centres PSII β et PSII α , sous l'effet de la photoinhibition, ne peut pas se faire à faible température (4 °C). Comme mentionné dans le Chapitre II, c'est la même température que nous avons utilisée tout le long de ce travail, ce qui nous permet d'éliminer d'emblée l'hypothèse de la conversion des centres α en β . Les résultats de van Wijk et al. indiquent la présence d'unités PSII α plus résistants à la photoinhibition. Ces centres PSII α ne semblent pas être affectés par la réduction excessive de leurs Q_A, mais sont plutôt inactivés dans leur fonction du côté donneur, c'est à dire au niveau du complexe de dégagement d'oxygène. (van Wijk et al., 1993).

3. 3. 3. Effet de la photoinhibition sur les PSII dépourvus de complexes de dégagement d'oxygène

Après l'élimination probable des hypothèses de la participation du PSI et des centres PSII β localisés dans les lamelles stromatiques dans l'emmagasinage de l'énergie photosynthétique persistant quand toute la fluorescence variable a été éliminée, un seul candidat peut expliquer cet effet, et c'est le transport cyclique des électrons autour du PSII. Ce cycle transporte les électrons à partir de la première séparation des charges jusqu'à Q_A et assure leur retour au P680⁺ à travers le complexe du cytochrome b-559.

D'après la littérature, nous savons que la perturbation du complexe de l'oxydation de l'eau affecte fortement la résistance de ce type de transport à la photoinhibition (Jegershöld et al., 1990) à cause de la forte probabilité des réactions de recombinaisons entre Phé⁻ et P680⁺. Ainsi, nous avons procédé à l'extraction des trois protéines extrinsèques du complexe de dégagement d'oxygène, 33, 24, et 16 KDa, et du groupement Mn par un lavage au Tris-NaOH. La préparation obtenue n'a présenté aucun dégagement d'O₂.

Le traitement photoinhibiteur n'a nécessité cette fois-ci que 6 min pour éliminer toute la fluorescence variable. Cependant, une différence notable par rapport aux PSII non traités consiste du fait que dans ces particules non oxygéniques, toute l'émission thermique variable a été éliminée simultanément avec la disparition totale de la fluorescence variable.

L'analyse de la photoinhibition du côté donneur du PSII, observée quand les réactions du clivage de l'eau sont inhibées (Blubaugh et al., 1991), montre que c'est le cytochrome b-559 qui joue le rôle clé dans ce processus. En effet, Barber et De Las Rivas (1993) ont montré que ce cytochrome est responsable de la protection contre la photoinhibition du côté donneur. Quand le cyt b-559 est dans son état de faible potentiel, il peut accepter des électrons directement de la phéophytine réduite. Ces électrons sont transmis au $P680^+$ dont la durée de vie est très longue et qui constitue par là un radical potentiellement dangereux pour les espèces qui l'entourent. Quand le système d'oxydation de l'eau est fonctionnel, c'est lui qui alimente rapidement $P680^+$ en électrons qui lui permettent de revenir à son état fondamental. Toutefois, après l'extraction des protéines du complexe d'oxydation de l'eau, $P680^+$ ne se trouve plus protégé que par le transport cyclique régulé par le cytochrome b-559. Ce cytochrome ne peut cependant à lui seul assurer la réduction du $P680^+$ aussi efficacement que le complexe d'oxydation de l'eau car sa réoxydation est très lente (Barber et De Las Rivas, 1993). Ainsi, les dommages de la photoinhibition, moins contrôlés dans ce cas, empêchent tout emmagasinage de l'énergie dans le transport cyclique des électrons autour du PSII et provoque ainsi, la disparition totale et simultanée des émissions thermique et de fluorescence dans les PSII dépourvus de système d'oxydation de l'eau et de Mn.

Ce résultat représente un appui fort fondé de la participation du transport cyclique des électrons autour des PSII, qui peut être responsable de plus de 20% de l'émission thermique variable totale mesurée par spectroscopie photoacoustique. Cette portion de l'énergie reste emmagasinée plus longtemps dans les membranes et sert à protéger les systèmes photochimiques de la photoinhibition.

3. 3. 4. Conclusion

Depuis longtemps, l'étude de la régulation photochimique de l'émission thermique est basée sur des processus semblables à ceux gérant les variations de fluorescence. Toutefois, il a été toujours mentionné que, contrairement à l'émission de fluorescence, l'émission thermique semblait impliquer d'autres constituants membranaires que les PSII.

En effet, comme j'ai déjà indiqué dans l'introduction, la spectroscopie photoacoustique a été appliquée au PSI, aux études des états de transitions des CCLII et aux PSII sélectivement. Par notre étude, nous pouvons affirmer aujourd'hui que la régulation photochimique de l'émission thermique dans les thylacoïdes est contrôlée, en plus du transport linéaire des électrons, par un transport cyclique autour des PSII grâce à des unités PSII α plus résistantes à la photoinhibition, et qui sont strictement régulées par l'état d'efficacité de la séparation primaire des charges au niveau de leurs P680⁺.

Si l'on se propose de résumer les résultats que l'on a obtenu dans cette section, nous pouvons dire que la désactivation thermique, contrairement à l'émission de fluorescence, est contrôlée à près de 75% par le transport linéaire au niveau du PSII, alors que près de 25 % par le transport cyclique autour des PSII. Ces résultats montrent clairement que l'émission thermique, étant contrôlée en partie par des éléments membranaires moins sensibles à la photoinhibition, représente un moyen plus efficace dans la protection et l'adaptation des plantes contre les fortes luminosités. En d'autres termes, contrairement à la fluorescence, presque le quart de l'énergie photosynthétique totale reste plus longtemps emmagasiné dans le transport cyclique des électrons autour des PSII qui prend la relève quand le transport linéaire est inactivé par la photoinhibition, ce qui permet une dissipation plus proportionnée de l'excès de l'énergie et une protection plus efficace et plus sécuritaire contre les effets de la photoinhibition.

CHAPITRE IV

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Comme mentionné dans l'introduction, ce travail a pour but d'étudier la régulation de l'émission thermique dans les membranes photosynthétiques. Il a été axé sur deux volets principaux, le quenching non-photochimique et le quenching photochimique de l'émission thermique en comparaison avec l'émission simultanée de la fluorescence.

Pour le quenching non-photochimique, il a fallu tout d'abord analyser les variations dans les tracés photoacoustiques et les comparer aux variations qui se produisent dans les émissions de fluorescence. Ainsi, nous avons pu dégager une première corrélation qui montrait clairement que l'augmentation du quenching non-photochimique de la fluorescence est accompagnée par une augmentation concomitante de l'émission thermique.

Dans le but de quantifier ces variations, il était indispensable d'introduire un nouveau paramètre de calcul capable de mesurer la variation non-photochimique dans les tracés photoacoustiques, tout en restant comparable aux termes de quenching non-photochimique de fluorescence. Ce paramètre a été noté $q_N Q' = [(Q_m - Q_s) / Q_m] \times 100$.

L'utilisation de cette équation est une première, car jusqu'à présent, toutes les équipes utilisant la spectroscopie photoacoustique ne considèrent que le terme de l'emmagasinement de l'énergie photosynthétique qui est la différence entre l'émission de chaleur maximale en présence d'un faisceau saturant et l'émission de chaleur contrôlée par le faisceau de mesure photoacoustique et que l'on a appelé dans notre travail émission variable.

Une fois que les paramètres du quenching non-photochimique ont été déterminés, nous avons pu les utiliser pour une étude détaillée de la régulation thermique dans les thylacoïdes. Ainsi, nous avons suivi les effets de la tentoxine et d'un mélange de nigéricine et de valinomycine en présence de K^+ . La tentoxine a induit une augmentation remarquable du quenching non-photochimique de fluorescence, alors que la nigéricine/valinomycine a provoqué l'effet contraire. Toutefois, du point de vue thermique, la portion de l'énergie perdue dans l'émission de fluorescence pour chaque cas ne représentait que 1/5 environ de l'émission de chaleur totale. Ce résultat suggère fortement que l'émission thermique est directement affectée par les variations de l'acidité luminale.

Par la suite, et comme une application aux résultats précédents, nous avons testé les effets de la procaine et du DCCD qui ont tous les deux des modes d'action bien définis dans la membrane thylacoïdienne et dont on peut dégager des informations ciblées en ce qui concerne la régulation thermique. La procaine étant un anesthésique local, elle a agit spécifiquement sur le complexe b_6f qui ne pouvait plus transloquer les protons dans le lumen mais préfère plutôt les transférer directement au complexe de l'ATPsynthase via les domaines membranaires localisés dans la phase lipidique de la membrane. Le fait que la variation thermique soit la même pour un découplage membranaire général, et pour un découplage du à la conversion du couplage du mode diffus au mode localisé, indique que c'est la variation du pH luminal qui est responsable des variations thermiques et non l'énergisation de la membrane. Le même résultat a été obtenu par l'utilisation du DCCD qui diminue le pH luminal en bloquant l'extrusion des protons dans le lumen.

Ce résultat vient rejoindre les deux conclusions que nous avons données auparavant. Toutefois, il est généralement connu dans la littérature que q_E de fluorescence n'est pas exclusivement contrôlé par la variation du ΔpH , mais qu'il existe d'autres agents qui peuvent l'affecter indépendamment du pH. Dans la suite de notre étude, nous avons exploité cette dernière donnée pour déterminer d'une part l'effet de l'ascorbate et d'autre part l'effet d'un agent ADRY, FCCP sur les émissions simultanées de fluorescence et thermique.

L'ascorbate qui est connu pour être un élément indispensable dans le cycle des xanthophylles, provoque une forte amplification des phénomènes du quenching non photochimique de la fluorescence sans affecter pour autant le pH du lumen. Ce résultat a été particulièrement visible dans nos tracés de fluorescence. Pourtant, du côté thermique, aucune variation thermique n'a été observée en dépit des concentrations croissantes de l'ascorbate. Ce résultat révolutionnaire et totalement imprévu est venu confirmer différentes hypothèses quant à l'implication des changements structuraux de la membrane dans la formation du quenching non photochimique de fluorescence. Des réarrangements moléculaires des CCLII qui ont été postulés dans différents travaux semblent répondre parfaitement à nos résultats. Par là, nous avons pu dégager un modèle sommaire qui pourrait non seulement expliquer la stabilité de l'émission thermique en présence d'ascorbate, mais qui pourrait décrire une partie des mécanismes de la participation du quenching non-photochimique dans la protection contre le stress thermique.

Le deuxième produit utilisé pour étudier la régulation du quenching non-photochimique sans variation de pH luminal est FCCP. La perturbation du complexe d'oxydation de l'eau augmente la sensibilité à la photoinhibition. Le résultat obtenu montre qu'il se produit un important quenching non photochimique de photoinhibition pour la fluorescence accompagné par une forte augmentation de l'émission thermique par rapport aux contrôles. Ainsi, sous l'effet ADRY, le quenching non photochimique énergie-dépendant se déplace vers un quenching de photoinhibition, ce qui nous a permis par la même occasion d'exclure l'effet de la photoinhibition dans le cas de l'ascorbate.

En conclusion, nous pouvons dire d'après les résultats obtenus par cette étude, que la régulation de l'émission thermique, contrairement au quenching de fluorescence énergie-dépendant est exclusivement contrôlée par le pH luminal. Cette sélectivité pourrait différencier entre le quenching non photochimique énergie-dépendant du au ΔpH et celui qui est du à d'autres réactions membranaires comme la participation du cycle des xanthophylles. Ainsi, l'avantage qu'apporte la spectroscopie photoacoustique dans ce domaine, c'est qu'elle permet d'obtenir plus d'informations sur les mécanismes du quenching non photochimique qui ne sont pas encore résolus.

Le deuxième volet de ce travail a été consacré à l'étude de l'origine du signal photoacoustique par le biais de sa variation photochimique. Dans ce cas aussi, toutes les mesures ont été prises simultanément avec celles de la fluorescence. Dans un premier lieu, nous avons suivi la photoinhibition des membranes thylacoïdiennes pendant des durées croissantes de forte illumination jusqu'à ce que toute la fluorescence variable ait disparu. Cependant, et contrairement à l'émission de fluorescence, 26% de l'émission de chaleur variable persistait. Comme la fluorescence est exclusivement émise par le PSII, nous avons conclu que deux éléments membranaires, le PSI et les PSII β pouvaient être responsables de la portion thermique restante après l'élimination totale de la fluorescence variable.

Pour vérifier la validité de cette hypothèse, nous avons repris la même série d'expériences sur des extraits membranaires enrichis en PSII. Le même résultat que pour les thylacoïdes a été obtenu à part la disparition d'une petite portion supplémentaire de près de 6 % de l'émission thermique variable. Cette portion peut très bien provenir des conditions de préparation des échantillons des PSII. Nous avons considéré alors que c'est une petite portion de la population des PSII α , plus résistante à la photoinhibition et qui adopte un mode de transport cyclique de ces électrons, contrôlé par l'efficacité du système d'oxydation de l'eau, qui est responsable de la portion de l'énergie qui est dégagée thermiquement après la disparition totale de l'émission de fluorescence. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons repris les mêmes séries de photoinhibition mais cette fois-ci à l'aide de PSII dépourvus du complexe de dégagement d'oxygène et de Mn. Dans ce cas, la réduction du P680⁺ est altérée, et le taux de recombinaison entre P680⁺ et Phéo⁻ est très élevé. Dans cette expérience, toute l'émission thermique variable a été éliminée en même temps que l'émission de fluorescence. Ainsi, nous pouvons conclure que contrairement à la fluorescence variable, en plus du transport linéaire des électrons, l'émission thermique variable est aussi contrôlée par un transport cyclique autour des PSII. Ce résultat nécessite toutefois de plus amples preuves qui peuvent être apportés dans les études futures soit sur les centres réactionnels isolés, soit par l'analyse des différentes populations des PSII.

RÉFÉRENCES

- Anderson, J. M., Melis, A. (1983). "Localisation of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**, 745-749.
- Anderson, J. M. (1986). "Photoregulation of the composition, function and structure of thylacoid membranes". *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**, 62-66. 93-136
- Anderson, J. M., Chow, W. S., Goodchild, D. J. (1988). "Thylacoid membrane organisation in sun/shade acclimatation". *Aust. J. Plant Physiol.* **15**, 11-26.
- Anderson, J. M., and Andersson, B. (1988). "The dynamic photosynthetic membrane and regulation of solar energy conversion". *Trends in Biochemical Science* **13**, 351-355.
- Andersson, B., Akerlund, H-E. (1987). "Protein of the oxygen evolving complexe". *In The Light Reactions*, V 8, pp. 379-420. J. Barber ed. Topics in Photosynthesis. Elsevier, Amsterdam.
- Andersson, B., Styring, S. (1991). "Photosystem II: molecular organization, function, and acclimation". *In Current topics in Bioenergetics*. V 16. pp 1-81. Ed. Lee C. P. Academic Press, Inc. San Diego.
- Andersson, B., Salter, A. H., Virgin, I., Vass, I., Styring, S. (1992). "Photodamage to photosystem II - primary and secondary events". *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **15**, 15-31.
- Arnon, D. I. (1949) "Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*.". *Plant Physiol.* **24**, 1-15.

- Arntzen, B., Trebst, A. (1986). "On the role of the Q_B protein of PSII in photoinhibition". *FEBS Lett.* **194**, 43-49.
- Aro, E. M., Virgin, I., Andersson, B. (1993). "Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover". *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 113-134.
- Azzi, A., Casey, R. P., Nalcz, M. J. (1984). "The effect of N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide on enzyme of bioenergetic relevance". *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 209-226.
- Baker, N. R., Webber, A. N. (1987). "Interactions between photosystems". *Adv. Bot. Res.* **13**, 2-66.
- Barber, J., Mlalkin, S., Telfer, A. (1989). "The origin of chlorophyll fluorescence *in vivo* and its quenching by the photosystem II reaction centre". *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **223**, 227-239.
- Barber, J., De Las Rivas, J. (1993) A functional model for the role of cytochrome b559 in the protection against donor and acceptor side photoinhibition". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10942-46.
- Beard, W. A., Chiang, G. G., Dilley, R. A. (1988). "ATP formation onset lag and post-illumination phosphorylation initiated with single-turnover flashes. II: Two modes of post-illumination phosphorylation driven by either delocalised or localised proton gradient coupling". *J. Bioenerg. Biomembr.* **20**, 107-128.
- Bell, A. G. (1980). "On the production and reproduction of sound by light". *Am. J. Sci.* **20**, 305-311.
- Berthold, D.A., Babcock, G. T., Yocum, C. A. (1981). "A highly resolved oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes". *FEBS Lett.* **134**, 231-234.

- Björkman, O. (1987). "Low-temperature chlorophyll fluorescence in leaves and its relationship to photon yield of photosynthesis in photoinhibition". In *Photoinhibition*, ed. D. J. Kyle, C. B. Osmond, C. J. Arntzen, pp. 123-144. Amsterdam: Elsevier.
- Björkman, O., Demmig, B. (1987). "Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins". *Planta* **170**, 489-504.
- Black, M. T., Brarley, T. H., Horton, P. (1986). "Heterogeneity in chloroplast photosystem II". *Photosynth. Res.* **8**, 193-207.
- Blubaugh, D. J., Cheniae, G. M. (1990). "Kinetics of photoinhibition in hydroxylamine-extracted Photosystem II membranes: Relevance to photoactivation and sites of electron donation". *Biochemistry* **29**, 5109-5118.
- Bottin, H., Mathis, P. (1987). "Turn-over of electron donors in photosystem I : double-flash experiments with pea chloroplasts and photosystem I particles". *Biocim. Biophys. Acta* **892**, 91-98.
- Braslowsky, S. E. (1986). "Photoacoustic and photothermal methods applied to the study of radiationless deactivation processes in biological systems and in substances of biological interest". *Photochem. Photobiol.* **43**, 667-675.
- Breton, J. (1982). "Hypothesis-The F695 fluorescence of chloroplasts at low temperature is emitted from the primary acceptor of photosystem I". *FEBS Lett.* **147**, 16-20.
- Brettel, K. (1988). "Electron transfer from A1- to an iron-sulfur center with $t_{1/2}=200$ ns at room temperature in photosystem I. *FEBS Lett.* **239**, 93-98.
- Briantais, J. M., Vernotte, C., Picaud, M., Krause, G. H. (1979). "A quaitative study of slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts". *Biochim. Biophys. Acta* **548**, 128-138.

- Briantais, J. M., Vernotte, C., Krause, G. H., Weis, E. (1986). "Chlorophyll a fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves". pp. 539-583. Govindjee, Ames j., Fork, D. J., eds. *Light Emission by plant and Bacteria*. New york: Academic.
- Bryce, J. H., and Hill, S. A. (1993). In "Plant Biochemistry and Molecular Biology". (Lea, P. J., and Leegood, R. C., ed), Vol 1, pp. 1-26. John Wiley publishers, Chichester, England.
- Buschmann, C., Prehn, H. (1981). "*in vivo* studies of radiative and non-radiative deexcitation processs of pigments in *Raphanus seedlings* by photoacoustic spectroscopy". *Photobiochem. Photobiophys.* **2**, 209-215.
- Buschmann, C., Prehn, H., Lichtenhaler, H. (1984). "Photoacoustic spectroscopy (PAS) and its application in photosynthesis research". *Photosynth. Res.* **5**, 29-46.
- Buschmann, C. (1989). "Photosynthetic measurments : application in plant science". *Phil. Trans R. Soc. Lond. B* **323**, 423-434.
- Buschmann, C., Kocsanyi (1989). "Light-induced heat production correlated with fluorescence and its quenching mechanism". *Photosynth. Res.* **21**, 129-136.
- Butler, W. L. (1977). "Chlorophyll fluorescence : a probe for electron transfer". In *Encyclopedia of Plant Physiology* , ed. A. Trebst, M. Avron, **5**, 149-167. Berlin : Springer-Verlag.
- Butler, W. L. (1978). "Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis". *Annu. Rev. Plant Physiol.* **29**, 345-78.
- Canaani, O., Barber, J., Malkin, S. (1984). "Evidence that phosphorylation and dephosphorylation regulate the distribution of excitation energy between the two photosystems of photosynthesis *in vivo*: Photoacoustic and fluorimetric study of an intact leaf". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1614-1618.

- Canaani, O. (1986). "Photoacoustic detection of oxygen evolution and state 1-state 2 transitions in cyanobacteria". *Biochim. Biophys. Acta* **852**, 74-80.
- Canaani, O (1990). "Photoacoustic studies on the dependence of state transitions on grana stacking". *Photosynth. Res.* **25**, 225-232.
- Carpentier, R., LaRue, B., Leblanc, R. M. (1983 a). "Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans*. I. Effects of sample thickness on the photoacoustic signal". *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 403-410.
- Carpentier, R., LaRue, B., Leblanc, R. M. (1983 a). "Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans*. II. Characterisation of pigment holochroms and thermal deactivation spectrum". *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 411-415.
- Carpentier, R., LaRue, B., Leblanc, R. M. (1983 a). "Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans*. III. Detection of photosynthetic activities". *Arch. Biochem. Biophys.* **228**, 534-543.
- Carpentier, R., Nakatani, H. Y. (1985). "Inhibitors affecting the oxidizing side of photosystem II at the Ca^{2+} - and Cl^- -sensitive sites". *Biochim. Biophys. Acta* **808**, 288-292.
- Carpentier, R., Nakatani, H. Y., Leblanc, R. M. (1985). "Photoacoustic detection of energy conversion in a Photosystem II submembrane preparation from spinach". *Biochim. Biophys. Acta* **808**, 470-473.
- Carpentier, R., Leblanc, R. M., Mimeault, M. (1987). "Photoinhibition and chlorophyll photobleaching in immobilised thylacoid membranes". *Enzyme Microb. Thechnol.* **9**, 489-493.
- Carpentier, R., Leblanc, R. M., Mimeault, M. (1988). "Monitoring Electron Transfer by Photoacoustic Spectroscopy in Native and Immobilised Membranes". *Biotechnology and Bioengineering* **32**, 64-67.
- Carpentier, R., Leblanc, R. M., Mimeault, M. (1989). "Photoacoustic detection of photosynthetic energy storage in Photosystem II submembrane fractions". *Biochimica. Biophysica. Acta* **975**, 370-376.

- Carpentier, R., Leblanc, R. M., Mimeault, M. (1990). "On the nature of the photosynthetic energy storage monitored by photoacoustic spectroscopy". *Photosynth. Res.* **23**, 313-318.
- Carpentier, R., Owens, T. G., Leblanc, R. M. (1991). "Simultaneous saturation of variable fluorescence yield and photoacoustically monitored thermal emission in thylakoid membranes". *Photochemistry and Photobiology* **53**, 565-569.
- Clarck, R. D., Hind, G. (1983). "Isolation of a five-polypeptide cytochrome b-f complex from spinach chloroplasts". *J. Biol. Chem.* **258**, 10348-10354.
- Cleland, R. E., Critchley, C. (1985). "Studies on the mechanism of photoinhibition in higher plants. II. Inactivation by high light of photosystem II reaction center function in isolated spinach thylacoids and O₂ evolving particles". *Photobiochem. Photobiophys.* **10**, 83-92.
- Cleland, R. E., Melis, A. Neale, P. J. (1986). "Mechanisms of photoinhibition: photochemical reaction center inactivation in system II of chloroplasts". *Photosynth. Res.* **9**, 79-88.
- Cramer W. A., Furbacher, P. N., Szczepaniak, A., and Tae, G.-S. (1990). In "Current Research in photosynthesis" (M. Baltscheffsky, ed.), Vol. 3, pp. 221-230. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Cramer, W.A., Tae, G-S., Fubacher, P. N., Böttger, M. (1993). "The enigmatic cytochrome b559 of oxygenic photosynthesis". *Physiologia Plantarum.* **88**, 705-711.
- Daldal, F., Tokito, M. K., Davidson, E., and Faham, M (1989). "Mutation conferring resistance to quinol oxidation (Qz) inhibitors of the cyt bc₁ complex of *Rhodobacter capsulatus*". *EMBO J.* **8**, 3951-3961.
- Debus, R. (1992). "The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution". *Biochim. Biophys. Acta* **1102**, 269-352.

- Demmig, B., Winter, K., Krüger, A., Cyzygan, F. C. (1987). "Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light". *Plant Physiol.* **84**, 218-224.
- Demmig-Adams, B. (1990). "Carotenoids and photoprotection in plants: a possible role for the xanthophyll zeaxanthin". *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 1-24.
- Dilley, R. A. (1991). "Energy coupling in chloroplasts". In *Current topics in Bioenergetics*. V16, pp 265-318. Ed. Lee C. P. Academic Press, Inc. San Diego.
- Duysens, L. N. M., Sweers, H. E. (1963). "Mechanism of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence". In *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, Jpn. Soc. Plant Physiol., pp. 353-72. Tokyo: Univ. Tokyo Press.
- Eaton-Rye, J. J., Govindjee (1988). "Electron transfer through the quinone acceptor complex of photosystem II after one or two actinic flashes in bicarbonate-depleted spinach thylakoid membranes". *Biochim. Biophys. Acta* **935**, 248-257.
- Finazzi, G., Ehrenheim, A. M., Forti, G. (1993). "Influence of different uncouplers on Photosystem II photochemistry and fluorescence". *Biochim. Biophys. Acta* **1142**, 123-128.
- Forti, G., Ehrenheim, A., (1993). "The role of ascorbic acid in photosynthetic electron transport". *Biochim. Biophys. Acta* **1183**, 408-412.
- Förster, V., Junge, W. (1985). "Stoichiometry and kinetics of proton release upon photosynthetic water oxidation". *Photochem. Photobiol.* **41**, 183-190.
- Fuks, B., Hombe, F., Van Eyken, F., Figeys, H., Lannoye, R. L. (1992). "Photoacoustic spectroscopy as a tool for monitoring herbicide effects on Triazine-resistant and susceptible biotypes of Black Nightshade (*Solanum nigrum*). *Weed Science* **40**, 371-377.

- Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N. R. (1989). "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 87-92.
- Genty, B., Harbinson, J., Briantais, J. -M., Baker, N. R. (1990). " The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem 2 photochemistry in leaves ". *Photosynth. Res.* **25**, 249-57.
- Gilmore, A. M., Yamamoto, H. Y. (1992). "Dark induction of zeaxanthin-dependent nonphotochemical fluorescence quenching mediated by ATP". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1899-1903.
- Gilmore, A. M., Yamamoto, H. Y. (1993). "Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explain zeaxanthin independent quenching". *Photosynth. Res.* **35**, 67-78.
- Glaser, E., Norling, B. (1991). "Chloroplast and plant mitochondrial ATP synthases". In *Current topics in Bioenergetics*. V16. pp 223-263. Ed. Lee C. P. Academic Press, Inc. San Diego.
- Gounaris, K., Chapman, D. J., Barber, J. (1990 a). In *Current Research in Photosynthesis* (M. Baltscheffsky,ed.) Vol. 1, pp. 327-330. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Gounaris, K., Chapman, D., Booth. J, Crystall, P. J., Giorgi, L. B., Klug, D. R., Porter, G., Barber, J. (1990 b). "Comparison of the D1/D2/Cytochrome b-559 reaction center complex of photosystem two isolated by two different methods". *FEBS Lett.* **256**, 88-92.
- Gruszecki, W. I., Krupa, Z. (1993). "LHCII, the major light-harvesting pigment-protein complex is zeaxanthin epoxidase". *Biochim. Biophys. Acta* **1144**, 97-101.
- Guenther, J. E., Melis, A. (1990). "The physiological significance of photosystem II heterogeneity in chloroplasts". *Photosynth. Res.* **23**, 105-109.

- Guenther, J. E., Melis, A. (1990). "Dynamics of photosystem II heterogeneity in *Dunaliella salina* (green algae)". *Photosynth. Res.* **23**, 195-203.
- Hager, A., Holocher, K. (1994). "Localisation of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxydase within the thylacoid lumen and abolition of its mobility by a (light-depebdent)pH decrease". *Planta* **192**, 581-589.
- Hauksa, G., and Hurt, E. C., Gabellini, N., and Lockau, W. (1983). "Comparative aspects of quinol-cytochrome c / Plastocyanin oxidoreductases". *Biochim. Biophys. Acta* **726**, 97-133.
- Havaux, M. (1990). "Energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence and thermal energy dissipation in intact leaves during induction of photosynthesis". *Photoschem. Photobiol.* **51**, 481-486.
- Havaux, M. (1992). "Photoacoustic spectroscopy measurments of cyclic electron flow around photosynthetic photosystem I in leaves adapted to light-State 1 and 2". *Plant Cell Physiol.* **33**, 799-803.
- Heber, U., Neimanis, S., Dietz, K. J., Viil, J. (1986). "The assimilatory power as a driving force in photosynthesis". *Biochim. Biophys. Acta* **852**, 144-155.
- Herbert, S. K. (1986). "Photoinhibition resistance in the red alga *Porphyra perforata*. The role photoinhibition repair". *Plant Physiol.* **92**, 514-519.
- Herbert, S.K., Fork, D. C., Malkin, S. (1990). "Photoacoustic measurments *in vivo* of energy storage by cyclic electron in algae and higher plants". *Plant Physiol.* **94**, 962-934.
- Hippler, M., Ratajczak, R., and Haehnel, W. (1989). "Identification of the plastocyanin binding subunit of photosystem I". *FEBS Lett.* **250**, 280-284.
- Horton, P. Hague, A. (1988). "Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts IV. Resolution of non-photochemical quenching". *Biochim. Biophys. Acta* **932**, 107-15.

- Horton, P., Ruban, A. V., Rees, D., Pascal, A. A., Nocyor, G., Young, A. J. (1991). "Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of LHC II chlorophyll-protein complexes". *FEBS Lett.* **292**, 1-4.
- Jahns, P., Junge, W. (1988). "The photosynthetic water oxidase: its proton pumping activity is short-circuited within the protein by DCCD". *The EMBO Journal.* **7**, 589-594.
- Jahns, P., Junge, W. (1989). "The protonic shortcircuit by DCCD in photosystem II. A common redox transitions of water oxidation". *FEBS Lett.* **253**, 33-37.
- Jahns, P., Junge, W. (1990). "Dicyclohexylcarbodiimide-binding protein is related to the short circuit of the proton-pumping activity of photosystem II". *Eur. j. Biochem.* **193**, 731-736.
- Jegerschöld, C., Virgin, I., Styring, S. (1990). "Light-dependent degradation of the D1 protein in photosystem II is accelerated after inhibition of the water splitting reaction". *Biochemistry* **29**, 6179-6186.
- Klimov, V. V., Klevanik, A. V., Shuvalov, V. A., Krasnovsky, A. A. (1977). "Reduction of pheophytin in the primary light reaction of photosystem II". *FEBS Lett.* **82**, 183-186.
- Klimov, V. V., Krasnovsky, A. A. (1981). "Pheophytin as a primary electron acceptor in photosystem II reaction center". *Photosynthetica* **15**, 592-609.
- Krause, G. H., Behrend, U. (1986). "ΔpH-Dependant chlorophyll fluorescence quenching indicating a mechanism of protection against photoinhibition of chloroplasts". *FEBS Lett.* **200**, 298-302.
- Krause, G. H., Laasch, H., Weis, E. (1988). "Regulation of thermal dissipation of absorbed light energy in chloroplasts indicated by energy-dependent fluorescence quenching". *Plant Physiol. Biochem.* **26**, 445-452.

- Krause, G. H., Somersalo, S., Zumbusch, E., Weyers, B., Laasch, H. (1990). "On the mechanism of photoinhibition in chloroplasts. Relationship between changes in fluorescence and activity of Photosystem II". *J. Plant Physiol.* **136**, 472-479.
- Krause, G. H., Weis, E. (1991). "Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics". *annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 313-349.
- Kreimer, G., Melkonian, M., Holtum, J. A. M., Latzko, E. (1988). "Stromal free Calcium concentration and light-mediated activation of chloroplast fructose-1,6-biphosphatase". *Plant Physiol.* **86**, 423-428.
- Krieger, A., Weis, E. (1990). "pH-Dependent quenching of chlorophyll fluorescence in isolated PSII particles : dependence on the redox potential". In *Current Research in Photosynthesis*. V 1, pp. 563-569. Baltscheffsky M. ed. Dordrecht, Kluwer.
- Krieger, A., Weis, E. (1993). "The role of calcium in the pH-dependent control of photosystem II". *Photosynth. Res.* **37**, 117-130.
- Kuhlbrandt, W., Wang, D. N. (1991). "Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography". *Nature* **350**, 130-134
- Kuhlbrandt, W., Wang, D. N., Fujiyoshi, Y. (1994). " Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography". *Nature* **67**, 614-621.
- Kyle, D. J., Ohad, I., Arntzen, C. (1984 a). "Membrane protein damage and repair: Selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4070-4074.
- Kyle, D. J., Ohad, I., Guy, R., Arntzen, C. (1984). "Selective thylacoid protein damage and repair during photoinhibition". In *Advances in photosynthesis Research*, V III, pp. 167-170. Sybesma C. ed. The Hague:: Martinus Nijhoff Dr W. Junk Publishers.

- Laasch, H. (1987). "Non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts under conditions of stressed photosynthesis. *Planta* **171**, 220-226.
- Laasch, H., Weis, E. (1989). "Photosynthetic control, "energy dependant" quenching of chlorophyll fluorescence and photophosphorylation under influence of tertiary amines". *Photosynth. Res.* **22**, 137-46.
- Laasch, H, Ihle, C., Günther, G. (1993). "Detecting localised proton currents in photophosphorylation by procaine inhibition of the transthylakoid pH-gradient". *Biochimica. Biophysica. Acta* **1140**, 251-261.
- Lapointe, L., Huner, N. P. A., Leblanc, R. M. (1993). "Possible photoacoustic detection of cyclic electron transport around photosystem II in photoinhibited thylakoid preparations". *Biochim. Biophys. Acta* **1142**, 43-48.
- Lasser-Ross, N., Malkin, S., Cahen, D. (1980). "photoacoustic detection of photosynthetic activities in isolated broken chloroplasts". *Biocim. Biophys. Acta* **593**, 330-341.
- Maenpää, P., Aro, E., Somersalo, S., Tyystjarvi, E. (1988). "Rearrangement of the chloroplast thylacoid at chilling temperature in the light". *Plant physiol.* **87**, 762-766.
- Malkin, S., Cahen, D. (1979). "Photoacoustic spectroscopy and radiant energy conversion: Theory of the effect with special emphasis on photosynthesis". *Photochem. Photobiol.* **29**, 803-813.
- Malkin, S. (1987) "Fast photoacoustic transients dark-adapted intact leaves: Oxygen evolution and uptake pulses during photosynthetic induction- a phenomenology record". *Planta* **171**, 65-72.
- Mathis, P., Setif, P. (1988). "Kinetic studies on the function of A₁ in the photosystem I reaction center". *FEBS Lett.* **237**, 65-68.

- Mattoo, A. K., Marder, J. B. (1989). "Dynamic of the photosystem II reaction center". *Cell* **56**, 241-246.
- Mei, R., Green, J. P., Sayre, R. T., and Frash, W. D. (1989). "Manganese-binding proteins of the oxygen-evolving complex. *Biochemistry* **28**, 5560-5567.
- Mende, D., and Wiessner, W. (1983). "Participation of photosystem II in regulation of photosynthetic electron transport in the green alga *Chlamydomonas stellata*. *Photobiochem. Photobiophys.* **6**, 1-7.
- Metz, J. G., Nixon, P. J., Rôgner, M., Brudvig, G. W., and Diner, B. A. (1989). "Directed alteration of D1 polypeptide of photosystem II: Evidence that Tyrosine-161 is the redox component, Z, connecting the oxygen-evolving complex to the primary electron donor, P680 . *Biochemistry* **28**, 6960-6969.
- Miyake, C., Asada, K. (1992) "Thylakoid-bound ascorbic peroxidase in spinach chloroplast and photoreduction of its primary oxydation product monohydroascorbate radicals in thylakoids". *Plant Cell Physiol.* **33**, 541-553.
- Morrissey, P. J., Glick, R.E., and Melis, A. (1989). "Supramolecular assembly and function of subunits associated with the chlorophyll ab light-harvesting complex II (LHCII) In soybean chloroplasts" *Plant Cell Physiol.* **30**, 335-344.
- Mulineaux, C. W. (1993). "Excitation energy quenching in aggregates of LHCII chlorophyll-protein complex: a laser optoacoustic study". *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 235-238.
- Murata, N., and Miyao, M., and Kuwabara, T. (1983). In *"The Oxygen Evolution Systems of Photosynthesis"* (Y Inoue, A. R. Crofts, Govindjee, N. Murata, G. Renger, and K. Satoh, eds.), pp. 213-222. Academic Press, Tokyo.

- Nabederyk, E., Andrianambinntsoa, S., Berger, G., Leonard, M., Mantele, W., Breton, J. (1990). "Characterization of bonding interactions of the intermediary electron acceptor in the reaction center of photosystem II by FTIR spectroscopy. *Biochim. Biophys Acta* **1016**, 49-54.
- Nanba, O., Satoh, K. (1987). "Isolation of photosystem II reaction centre consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 109-112.
- Neale, P. J., Melis, A. (1990). "Activation of a reverse pool of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* counteracts photoinhibition". *Plant Physiol.* **92**, 1196-1204.
- Nedbal, L., Samson, G., Whitmarsh, J. (1992). "Redox state of a one-electron component controls the rate of photoinhibition of photosystem II". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7929-7933.
- Nixon, P. J., Diner, B. A. (1992). "Aspartate 170 of the photosystem II reaction center polypeptide D1 is involved in the assembly of the oxygen-evolving manganese cluster". *Biochemistry* **31**, 942-948.
- Noctor, G., Horton, P. (1990). "Uncoupler titration of energy-dependent chlorophyll fluorescence quenching and photosystem II photochemical yield in intact pea chloroplasts". *Biochim. Biophys. Acta* **1016**, 228-234.
- Ono, T., and Inoue, Y. (1984). "Ca²⁺-dependent restoration of O₂-evolving activity in CaCl₂-washed PSII particles depleted of 33, 24 and 16 KDa polypeptides". *FEBS Lett.* **168**, 281-286.
- Owens, T. G., Carpentier, R., Leblanc, R. M. (1990). "Detection of photosynthetic energy storage in a photosystem I reaction center preparation by photoacoustic spectroscopy". *Photosynth. Res.* **24**, 201-208.
- Ouzounidou, G., Lannoye, R., Karataglis, S. (1993). "Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in intact leaves under copper stress". *Plant Science* **89**, 221-226.

- Popovic, R., Beauregard, M., Leblanc, R. M. (1987). "Study of energy storage processes in bundle sheath cells of *zea mays*". *Plant Physiol.* **84**, 1437-1441.
- Poulet, P., Cahen, D., Malkin, S. (1983). "Photoacoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves. Quantitative analysis on phase and amplitude measurements". *Biochim. Biophys. Acta* **724**, 433-446.
- Powles, S. (1984). "Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light". *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 15-44
- Quick, P., Sheibe, R., Stitt (1989). "Use of tentoxin and nigericin to investigate the possible contribution of ΔpH to energy dissipation and the control of electron transport in spinach leaves". *Biochim. Biophys. Acta* **974**, 282-288.
- Rashid, A., Carpentier, R. (1989). "CaCl₂ inhibition of H₂O₂ electron donation to photosystem II in submembrane preparations depleted in extrinsic polypeptides". *FEBS Lett.* **258**, 331-334.
- Rashid, A., Carpentier, R. (1991). "Ca²⁺ stimulation of the inhibitory action of carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) in photosystem 2". *Photosynthetica* **25**, 441-446.
- Ruban, A. V., Horton, P. (1992). "Mechanism of ΔpH -dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. I. Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complexes". *Biochimica. Biophysica. Acta* **1102**, 33-38.
- Ruban, A. V., Walters, R. G., Horton, P. (1992 a). "The molecular mechanism of the control of excitation energy dissipation in chloroplast membranes. Inhibition of ΔpH -dependent quenching of chlorophyll fluorescence by dicyclohexylcarbodiimide". *FEBS Lett.* **309**, 175-179.

- Ruban, A. V., Rees, D., Pascal, A. A., Horton, P. (1992 b). "Mechanism of ΔpH -dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. II. The relationship between LHCII aggregation in vitro and qE in isolated thylakoids". *Biochimica. Biophysica. Acta* **1102**, 39-44.
- Ruban, A. V., Young, A. V., Horton, P. (1993). "Induction of non-photochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves". *Plant Physiol.* **102**, 741-750.
- Ruban, A. V., Young, A. V., Horton, P. (1994). "Modulation of chlorophyll fluorescence quenching in isolated light harvesting complex of photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta* **1186**, 123-127.
- Rosencwaig, A. (1980). "Photoacoustics and photoacoustic spectroscopy". New York, John Wiley.
- Schatz, G. H., Brock, H., Holzwarth, A. R. (1987). "Picosecond kinetics of fluorescence and absorbance changes in photosystem II particles excited at low photon density". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8414-8418.
- Schatz, G. H., Brock, H., Holzwarth, A. R. (1988). "A kinetic and energetic model for the primary processes in photosystem II". *Biophys. J.* **54**, 397-405.
- Schlodder, E., Brettel, K. (1988). "Primary charge separation in closed photosystem II with a lifetime of 11 ns. Flash absorption spectroscopy with oxygen evolving photosystem II complexes from *Synechococcus*". *Biochim. Biophys. Acta* **933**, 22-34.
- Schreiber, U., Schliwa, A., Bilger, W. (1986). "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer", *photosynth. Res.* **10**, 51-62.

- Schreiber, U., Neubauer, C. (1987). "The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation". *Z. Naturf.* **42c**, 1225-1264.
- Schreiber, U., Neubauer, C. (1989). "Correlation between dissipative fluorescence quenching at photosystem II and 50 μ s recombination luminescence". *FEBS Lett.* **258**, 339-342.
- Schreiber, U., Neubauer, C. (1990). "O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence". *Photosynth. Res.* **25**, 279-293.
- Shinkarev, V. P., Govindjee (1993). "Insight into the relationship of chlorophyll a fluorescence yield to the concentration of its natural quenchers in oxygenic photosynthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7466-69.
- Shuvalov, V. A., Nuijs, A. M., van Gorkom, H. J., Smit, H. W. J., Duysens, L. N. M. (1986). "Picosecond absorbance changes upon selective excitation of the primary electron donor P-700 in Photosystem I". *Biochim. Biophys. Acta* **850**, 319-323.
- Sigalat, C., de Kouchkovsky, Y., Haraux, F. (1993). "Flow-Force Relationships in Lettuce Thylakoids. 2. Effect of the uncoupler FCCP on Local Proton Resistance at the ATPase Level". *Biochemistry* **32**, 10201-10208.
- Somersalo, S., Krause, G. H. (1990). "Photoinhibition at chilling temperatures and effects of freezing stress on cold-acclimated spinach leaves in the field. A fluorescence study". *Physiol. Plant.* **79**, 617-622.
- Styring, S., Virgin, I., Ehrenberg, A., and Andersson, B. (1990). "Strong light photoinhibition of electron transport in photosystem II impairment of function of the first quinone acceptor". *Biochim. Biophys. Acta* **1015**, 269-278.

- Svensson, B., Vass, I., Cedergren, E., Styring, S. (1993). "Structure of donor-side components in photosystem II predicted by computer modelling". *EMBO J.*
- Telfer, A., and Barber, J. (1990). In "Current Research in Photosynthesis" (M. Baltscheffsky, ed.) Vol. 1, pp. 435-438. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Thayer, S. S., Björkman, D. (1992) "Carotenoid distribution and deepoxidation in thylacoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize". *Photosynthetic Res.* **33**, 213-225.
- Thompson, L. K., Brudvig, G. W. (1988). "Cytochrome b-559 may function to protect photosystem II from photoinhibition". *Biochemistry* **27**, 6653-58.
- Van-Dorssen, R. J., Breton, J., Plijter, J. J., Satoh, K., Van Gorkom, H. J., Ames, J. (1987). "Spectroscopic properties of the reaction center and of the 47 KDa chlorophyll protein of photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta* **893**, 267-274.
- Van-Wijk, K. J., Schnettger, B., Graf, M., Krause, G. H. (1993). "Photoinhibition and recovery in relation to heterogeneity of photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta* **1142**, 59-68.
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E. M., Andersson, B. (1992). "Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of Photosystem II. Stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1408-1412.
- Veeranjaneyulu, K., N'soukpoe-Kossi, C. N., Leblanc, R. M., (1991). "SO₂ effect on photosynthetic activities of intact sugar maple leaves as detected by photoacoustic spectroscopy". *Plant Physiol.* **97**, 50-54.
- Vermaas, W. F. J., Styring, S., Schröder, W. P., Andersson, B. (1993). "Photosynthetic water oxydation: the protein framework. *Photosynth. Res.* **38**, 249-263.

- Vernotte, C., Etienne, A. L., Briantais, J. M. (1979). "Quenching of the photosystem II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool". *Biochim. Biophys. Acta* **545**, 519-527.
- Virgin, I., Styring, S., and Andersson, B. (1988). "Photosystem II disorganization and manganese release after photoinhibition of isolated spinach thylakoid membranes". *FEBS Lett.* **233**, 408-412.
- Weis, E., Berry, J. A. (1987). "Quantum efficiency of photosystem II in relation to "energy" dependent quenching of chlorophyll fluorescence". *Biochim. Biophys. Acta* **894**, 198-208.
- Weis, E., Lechtenberg, D., Krieger, A. (1990). "Physiological control of primary photochemical energy conversion in higher plants". *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **323**, 253-268.
- Yakir, D., Rudish, J., Bravdo, B. A., Malkin, S. (1985). "Photoacoustic and fluorescence measurements of the chilling response and their relationship to carbon dioxide uptake in tomato plants". *Planta* **164**, 345-353.